

TESIS DOCTORAL

Caracterización de los sRNAs reguladores NsrR1 y NsiR3 de la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC 7120



Isidro Álvarez Escribano
Sevilla, 2019

Portada: Modelo de la estructura 3D de los sRNAs NsrR1 (izquierda) y NsiR3 (derecha). Los modelos fueron generados con RNAComposer (Popenda et al. 2012. *Nucleic Acids Research*, 40:e112. doi: 10.1093/nar/gks339).

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

Caracterización de los sRNAs reguladores NsrR1 y NsiR3 de la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC 7120

Trabajo presentado por **Isidro Álvarez Escribano** para optar al grado de Doctor



Isidro Álvarez Escribano

Sevilla, 2019

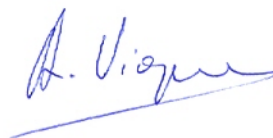
Directora



Dra. Alicia María Muro Pastor

Científica Titular del Consejo Superior
de Investigaciones Científicas

Director



Dr. Agustín Vioque Peña

Catedrático de la Universidad de Sevilla



FINANCIACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

Agradezco a las instituciones y fondos de financiación que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, que se ha llevado a cabo en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF, CSIC-US). La Tesis Doctoral ha sido financiada por un contrato predoctoral **FPI** del Ministerio de Economía y Competitividad, con referencia **BES-2014-068488**, adscrito a los proyectos **BFU2013-48282-C2-1-P** (RNAs no codificantes implicados en la adaptación al estrés de nitrógeno y la diferenciación celular en cianobacterias) del Ministerio de Economía y Competitividad y **BFU2016-74943-C2-1-P** (Participación de RNAs no codificantes en circuitos reguladores controlados por disponibilidad de nitrógeno en cianobacterias) de la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, cuya Investigadora Principal es la Doctora Alicia María Muro Pastor. Ambos proyectos están cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

A mis padres y mis hermanos, por vuestro apoyo

A Celia, otro reto más que superamos juntos

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores, Alicia y Agustín, por darme la oportunidad de realizar este trabajo con ellos. Gracias por vuestra total dedicación, vuestra paciencia, y vuestra constante atención y apoyo.

Agradezco a Elvira y a Manuel la ayuda que me han prestado durante todo este tiempo. Gracias por conseguir que tantas horas en el laboratorio, y fuera de él, fuesen mucho más amenas, así como por permitirme aprender de vosotros cada día.

A mi familia, por todo vuestro cariño y esfuerzo para ofrecerme la mejor educación y formación posible. A Curro, por seguir aprendiendo el uno del otro siempre. A Celia, por tu alegría y por enseñarme algo cada día. Tenerte a mi lado es lo mejor que me ha pasado.

Finalmente, para no olvidar a nadie, gracias a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a mi formación como persona y a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Las cianobacterias	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Aspectos metabólicos de las cianobacterias	8
1.1.2.1. Asimilación de carbono en cianobacterias: la fotosíntesis oxigénica	9
1.1.2.2. Asimilación de nitrógeno en cianobacterias.....	11
1.1.2.3. Adaptación de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 a la carencia de nitrógeno combinado	14
1.1.2.3.1. Degradación de los ficobilisomas. Papel de NblA	15
1.1.2.3.2. Diferenciación celular: el heterocisto	17
1.2. RNAs reguladores en bacterias	20
1.2.1. Tipos de RNAs reguladores.....	22
1.2.1.1. RNAs reguladores codificados en <i>cis</i>	23
1.2.1.2. RNAs reguladores codificados en <i>trans</i>	24
1.2.2. Métodos de identificación de RNAs reguladores y sus dianas	28
1.2.3. RNAs reguladores en cianobacterias	29
1.2.3.1. Identificación de RNAs reguladores en cianobacterias	29
1.2.3.2. Procesos regulados por RNAs en cianobacterias.....	31
OBJETIVOS.....	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. Organismos y condiciones de cultivo	43
2.1.1. Cianobacterias	43
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.....	43
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo.....	44
2.1.1.3. Métodos de recogida y lavado de células.....	45
2.1.1.4. Experimentos de inducción del desarrollo de heterocistos	45
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	46
2.1.2.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	46
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo.....	46
2.1.2.3. Métodos de recogida y lavado de células.....	46

2.2. Métodos de manipulación y análisis de DNA	47
2.2.1. Plásmidos utilizados	47
2.2.1.1. Plásmidos no contruidos en este trabajo.....	47
2.2.1.2. Plásmidos contruidos en este trabajo.....	49
2.2.2. Aislamiento de DNA.....	51
2.2.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	51
2.2.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	52
2.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	52
2.2.4. Purificación de fragmentos de DNA.....	52
2.2.5. Determinación de la concentración de DNA	53
2.2.6. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).....	53
2.2.6.1. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa	53
2.2.6.2. Procedimiento del “Megacebador”	56
2.2.7. Secuenciación del DNA	58
2.2.8. Tratamientos enzimáticos del DNA	58
2.2.8.1. Restricción del DNA	58
2.2.8.2. Desfosforilación del DNA.....	58
2.2.8.3. Ligación del DNA.....	58
2.2.9. Transferencia de DNA a bacterias	59
2.2.9.1. Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante transformación	59
2.2.9.2. Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante electroporación	59
2.2.9.3. Transferencia de DNA a <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 mediante conjugación triparental.....	60
2.3. Métodos de manipulación y análisis de RNA	62
2.3.1. Aislamiento de RNA total de cianobacterias	62
2.3.2. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de urea-poliacrilamida y transferencia a membranas de nailon.....	63
2.3.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído y transferencia a membranas de nailon	64
2.3.4. Detección de RNA mediante hibridación en membrana con sondas radiactivas (Northern blot)	65
2.3.5. Síntesis <i>in vitro</i> y marcaje radiactivo de RNA	66
2.3.6. Análisis de la estructura del RNA NsrR1	67
2.3.7. Análisis de la interacción de NsrR1 y las regiones 5’UTR de los mRNAs de <i>nblA</i> y <i>all1871</i>	68

2.4. Métodos de manipulación y análisis de proteínas	68
2.4.1. Preparación de extractos celulares cianobacterianos	68
2.4.2. Métodos de cuantificación de proteínas	69
2.4.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	69
2.4.4. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de las proteínas All1871 y NblA recombinantes para la producción de anticuerpos	70
2.4.4.1. Expresión de las proteínas All1871 y NblA recombinantes y preparación del extracto	70
2.4.4.2. Purificación de las proteínas All1871 y NblA recombinantes	71
2.4.5. Producción y purificación de anticuerpos frente a las proteínas All1871 y NblA	73
2.4.6. Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y detección inmunológica (Western blot)	73
2.4.7. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	74
2.5. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos	75
2.5.1. Determinación del contenido de clorofila	75
2.5.2. Espectros de absorción de células enteras de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	75
2.6. Ensayos para la validación <i>in vivo</i> de la interacción entre un sRNA y los mRNAs diana	76
2.7. Ensayo de la actividad nitrogenasa.....	79
2.8. Microscopía confocal láser para la detección de la proteína GFP en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	80
2.9. Tinción de proheterocistos y heterocistos con azul Alcian	80
2.10. Análisis bioinformático de secuencias de DNA y proteínas	80
RECETARIO	83
3. RESULTADOS	89
3.1. CAPÍTULO I.....	91
NsiR3, un sRNA cuya expresión se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado	91
3.1.1. Identificación de NsiR3 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	93
3.1.2. Regulación de la expresión de <i>nsiR3</i> por NtcA	95
3.1.3. Selección de posibles mRNAs diana de NsiR3	96
3.1.4. Validación de la interacción entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados	102
3.1.5. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de <i>alr2431</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	108
3.1.6. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de <i>putA</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	109

3.2. CAPÍTULO II.....	113
NsrR1, un sRNA cuya expresión se reprime en condiciones de carencia de nitrógeno combinado	113
3.2.1. Identificación de NsrR1 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	115
3.2.2. Regulación de la expresión de <i>nsrR1</i> por NtcA.....	118
3.2.3. Selección de posibles mRNAs diana de NsrR1	119
3.2.4. Validación de la interacción entre NsrR1 y los mRNAs seleccionados	122
3.2.5. Regulación ejercida por NsrR1 sobre el mRNA de <i>nblA</i>	125
3.2.5.1. Verificación de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de <i>nblA</i>	125
3.2.5.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de <i>nblA</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	131
3.2.6. Regulación ejercida por NsrR1 sobre el mRNA de <i>all1871</i>	135
3.2.6.1. Verificación de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de <i>all1871</i>	135
3.2.6.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de <i>all1871</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	140
3.2.7. Caracterización funcional de la proteína All1871	144
3.2.7.1. Localización de la expresión de <i>all1871</i> en los filamentos de	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 durante el proceso de diferenciación de	
los heterocistos	144
3.2.7.2. Caracterización de un mutante de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 carente de proteína All1871.....	145
3.2.7.3. Expresión de <i>all1871</i> en relación con la disponibilidad de carbono.....	151
4. DISCUSIÓN.....	155
4.1. NsiR3, un sRNA inducible en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA	159
4.1.1. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de <i>alr2431</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	162
4.1.2. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de <i>putA</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	163
4.2. NsrR1, un sRNA reprimible en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA	166
4.2.1. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de <i>nblA</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	167
4.2.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de <i>all1871</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	172
5. CONCLUSIONES.....	179
BIBLIOGRAFÍA.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estirpes de cianobacterias representativas de las secciones establecidas en la clasificación morfológica de Rippka et al., 1979.....	5
Figura 1.2. Árbol filogenético de las cianobacterias según Shih et al., 2013	6
Figura 1.3. Representación esquemática de la degradación de los ficobilisomas durante la deficiencia de nitrógeno combinado	16
Figura 1.4. Diferenciación de heterocistos y relaciones funcionales entre heterocistos y células vegetativas.....	17
Figura 1.5. Biogénesis de los RNAs reguladores	21
Figura 1.6. Circuitos reguladores mixtos que involucran un sRNA y un factor de transcripción.....	22
Figura 1.7. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los asRNAs.....	23
Figura 1.8. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los ribointerruptores	24
Figura 1.9. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los sRNAs codificados en <i>trans</i>	26
Figura 2.1 Procedimiento del “Megacebador”	57
Figura 2.2. Sistema de transferencia por capilaridad de RNA en geles de agarosa a membranas de nailon	64
Figura 2.3. Purificación de las proteínas All1871 y NblA recombinantes mediante cromatografía de afinidad por níquel.....	72
Figura 2.4. Esquema del sistema heterólogo implementado en <i>E. coli</i> utilizado para la validación <i>in vivo</i> de la interacción entre un sRNA y sus mRNAs diana.....	77
Figura 2.5. Representación esquemática de la construcción de un plásmido derivado de pXG-30 para la validación <i>in vivo</i> de la interacción entre un sRNA y una secuencia correspondiente al interior de una región de un mRNA policistrónico	78
Figura 3.1. Representación esquemática de la región que codifica NsiR3 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	93
Figura 3.2. Alineamiento de los homólogos de NsiR3 identificados en Brenes-Álvarez <i>et al.</i> , 2016 y modelo de la estructura secundaria de NsiR3 según Mfold	94
Figura 3.3. Análisis de la expresión de NsiR3 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	94
Figura 3.4. Comparación de las secuencias promotoras de los homólogos de NsiR3 identificados en Brenes-Álvarez <i>et al.</i> , 2016	95
Figura 3.5. Unión de la proteína NtcA a la región promotora de NsiR3	96
Figura 3.6. Comparación entre la estirpe <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y la estirpe mutante Δ <i>nsiR3</i> de los cambios transcripcionales que ocurren tras 8 horas (N_2) en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado	97
Figura 3.7. Interacciones entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados para su estudio	101

Figura 3.8. Verificación <i>in vivo</i> mediante un sistema heterólogo en <i>E. coli</i> de la interacción entre NsiR3 y la región 5'UTR de los mRNAs seleccionados.....	104
Figura 3.9. Verificación <i>in vivo</i> mediante un sistema heterólogo en <i>E. coli</i> de las interacciones entre NsiR3 y la región 5'UTR de <i>putA</i> y de <i>alr2431</i>	107
Figura 3.10. Identificación mediante Northern blot del transcrito de <i>alr2431</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y efecto de NsiR3 sobre la acumulación del mismo	109
Figura 3.11. Análisis de la regulación del transcrito de <i>putA</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	110
Figura 3.12. Efecto de NsiR3 sobre la acumulación del transcrito de <i>putA</i> en estirpes con niveles alterados de NsiR3	111
Figura 3.13. Representación esquemática de la región que codifica NsrR1 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	115
Figura 3.14. Alineamiento de los homólogos de NsrR1 identificados en Brenes-Álvarez <i>et al.</i> , 2016	116
Figura 3.15. Análisis de la expresión de NsrR1 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes CSE2 y 216.....	116
Figura 3.16. Análisis de la expresión de NsrR1 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 tras la adición de amonio	117
Figura 3.17. Comparación de las secuencias promotoras de los homólogos de NsrR1 identificados en Brenes-Álvarez <i>et al.</i> , 2016.....	118
Figura 3.18. Unión de la proteína NtcA a la región promotora de NsrR1.....	119
Figura 3.19. Interacciones entre NsrR1 y los mRNAs diana seleccionados para su estudio	121
Figura 3.20. Verificación <i>in vivo</i> mediante un sistema heterólogo en <i>E. coli</i> de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de los mRNAs seleccionados.....	124
Figura 3.21. Verificación <i>in vivo</i> mediante un sistema heterólogo en <i>E. coli</i> de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de <i>nblA</i>	127
Figura 3.22. Identificación de la zona de interacción de NsrR1 con la región 5'UTR del mRNA de <i>nblA</i> y modelo de estructura secundaria de NsrR1.....	129
Figura 3.23. Conservación de la interacción predicha entre NsrR1 y el mRNA de <i>nblA</i> en cianobacterias	130
Figura 3.24. Crecimiento de la estirpe $\Delta nsrR1$ en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno.....	131
Figura 3.25. Identificación mediante Northern blot de los transcritos de <i>nblA</i> regulados por nitrógeno en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	132
Figura 3.26. Efecto de NsrR1 sobre la acumulación de los transcritos de <i>nblA</i> regulados por nitrógeno	133
Figura 3.27. Detección de NblA en células de <i>E. coli</i>	134
Figura 3.28. Análisis del contenido de pigmentos celulares en células de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	135
Figura 3.29. Verificación <i>in vivo</i> mediante un sistema heterólogo en <i>E. coli</i> de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de <i>all1871</i>	137
Figura 3.30. Identificación de la zona de interacción de NsrR1 con la región 5'UTR del mRNA de <i>all1871</i>	138

Figura 3.31. Conservación de la interacción entre NsrR1 y el mRNA de <i>all1871</i> en cianobacterias	139
Figura 3.32. Regulación por nitrógeno del transcrito de <i>all1871</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes 216 y CSE2.....	140
Figura 3.33. Detección de All1871 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	141
Figura 3.34. Efecto de NsrR1 sobre la acumulación del transcrito de <i>all1871</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	142
Figura 3.35. Detección de All1871 en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y en la estirpe $\Delta nsrR1$	143
Figura 3.36. Expresión de la fusión traduccional <i>all1871::gfp</i> en filamentos de <i>Nostoc</i> sp. PCC7120	145
Figura 3.37. Comprobación de la estructura cromosómica de la estirpe <i>all1871::CK3</i>	146
Figura 3.38. Representación esquemática de la construcción del plásmido pIAE65, utilizado para la generación de la estirpe <i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i>	147
Figura 3.39. Crecimiento de las estirpes <i>all1871::CK3</i> y <i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i> en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno.....	148
Figura 3.40. Presencia de heterocistos en la estirpe <i>all1871::CK3</i>	148
Figura 3.41. Expresión del operón <i>nifHDK</i> en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes <i>all1871::CK3</i> y <i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i>	150
Figura 3.42. Expresión de los transcritos <i>all1871</i> y NsrR1 en respuesta a la disponibilidad de carbono en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	151
Figura 3.43. Efecto de la disponibilidad de CO ₂ en el crecimiento de la estirpe <i>all1871::CK3</i>	152
Figura 3.44. Crecimiento de las estirpes <i>all1871::CK3</i> y <i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i> en condiciones de limitación de carbono	153
Figura 4.1. Circuitos reguladores coherentes que combinan factores de transcripción y sRNAs en cianobacterias.....	158
Figura 4.2. Modelo de la regulación de <i>putA</i> por NsiR3	165
Figura 4.3. Sitios de unión de NtcA en algunos promotores reprimidos por NtcA.....	166
Figura 4.4. Modelo propuesto para la función de NsrR1 en la regulación de <i>nbIA</i>	171
Figura 4.5. Modelo propuesto para la regulación transcripcional que NtcA opera sobre NsiR3 y NsrR1, y la regulación postranscripcional que estos sRNAs ejercen sobre sus mRNAs diana según la disponibilidad de nitrógeno combinado	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Estirpes derivadas de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	43
Tabla 2.2. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	46
Tabla 2.3. Plásmidos utilizados no contruidos en este trabajo	47
Tabla 2.4. Plásmidos utilizados contruidos en este trabajo	49
Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	53
Tabla 2.6. Oligonucleótidos empleados para la generación de sondas radiactivas.....	66
Tabla 3.1. mRNAs candidatos a interaccionar con NsiR3 según la predicción de CopraRNA.....	99
Tabla 3.2. Información de aquellos genes candidatos a interaccionar con NsiR3 que presentan cambios significativos en el análisis del <i>microarray</i>	100
Tabla 3.3. Secuencias de los insertos clonados para la validación, mediante el sistema heterólogo en <i>E. coli</i> , de la interacción entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados como posibles dianas	102
Tabla 3.4. mRNAs candidatos a interaccionar con NsrR1 según la predicción de CopraRNA.....	120
Tabla 3.5. Secuencias de los insertos clonados para la validación, mediante el sistema heterólogo en <i>E. coli</i> , de la interacción entre NsrR1 y los mRNAs seleccionados como posibles dianas	123
Tabla 3.6. Actividad nitrogenasa de las estirpes <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, <i>all1871::CK3</i> y <i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i>	149

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las cianobacterias

1.1.1. Características generales

Las cianobacterias constituyen un grupo monofilético bien definido dentro de las eubacterias (Woese, 1987). La pared celular de las cianobacterias presenta las características típicas de las bacterias Gram-negativas, con una membrana externa que envuelve la capa de peptidoglicano, definiendo un espacio periplásmico entre la membrana externa y la membrana plasmática (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). No obstante, la pared celular cianobacteriana también presenta características propias de las bacterias Gram-positivas, como por ejemplo el mayor grosor de la capa de peptidoglicano (Hoiczky y Hansel, 2000).

La característica principal de este grupo de bacterias radica en contar con un aparato fotosintético similar en función y estructura al de los cloroplastos de las algas y plantas superiores, tratándose por tanto de los únicos organismos procariotas capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (DeRuyter y Fromme, 2008). En la actualidad está ampliamente aceptada la hipótesis de que los cloroplastos de algas y plantas superiores derivan de cianobacterias ancestrales que establecieron una relación de endosimbiosis con otra célula (Margulis, 1975; Alda *et al.*, 2014). A diferencia de las algas y plantas superiores, la mayoría de las cianobacterias carecen de clorofila *b* (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), y cuentan en las membranas tilacoidales con ficobilisomas como pigmentos antena. Así pues, en el aparato fotosintético cianobacteriano, una fracción importante de la captación de la luz tiene lugar a través de los ficobilisomas, estructuras supramoleculares constituidas por pigmentos antena, denominados genéricamente ficobiliproteínas (Grossman *et al.*, 1993b).

Se ha postulado que los ancestros de las cianobacterias tuvieron un papel muy importante en el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que se considera que fueron los primeros organismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, contribuyendo al desarrollo de la atmósfera actual (Buick, 1992). La capacidad bioquímica de utilizar agua como donador de electrones, con la consecuente producción de oxígeno, provocó uno de los mayores cambios en la evolución de la Biosfera, el paso de una atmósfera anóxica a una atmósfera con oxígeno (Lyons *et al.*, 2014), permitiendo posteriormente el desarrollo del metabolismo heterotrófico aeróbico (Falkowski *et al.*, 2005; Knoll, 2008). Aunque los primeros fósiles atribuidos a cianobacterias fueron encontrados en rocas sedimentarias generadas hace aproximadamente 3.500 millones de años (Schopf y Packer, 1987), en la actualidad se considera que la aparición de los primeros organismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica tuvo lugar hace unos 2.800 millones de años (Knoll, 2008).

Introducción

En la Biosfera actual las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos de una gran relevancia ecológica y medioambiental, dado que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de los ciclos del carbono, nitrógeno y oxígeno (Montoya *et al.*, 2004). Estas bacterias son responsables de una parte muy significativa de la fijación de CO₂ y de la producción de O₂ en nuestro planeta, ya que se considera que una proporción importante de la fijación de carbono que se produce en la Tierra tiene lugar en los océanos mediante fotosíntesis cianobacteriana. Algunas cianobacterias tienen además la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, jugando un papel muy relevante en el ciclo del nitrógeno.

El estilo de vida fotoautótrofo de las cianobacterias les ha permitido colonizar una gran variedad de nichos ecológicos, que abarcan desde océanos, aguas continentales y suelos de áreas templadas, hasta ambientes extremos como las regiones árticas, aguas termales y desiertos. Asimismo, algunas estirpes pueden vivir estableciendo relaciones de simbiosis con hongos, plantas, esponjas o protistas (Adams, 2000; Meeks y Elhai, 2002). Esta gran capacidad de adaptación a condiciones cambiantes de iluminación, temperatura, o disponibilidad de nutrientes, incluyendo en muchos casos la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, podría implicar la existencia de sistemas de regulación específicos, complementarios a otros generales encontrados en otras bacterias (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

Las cianobacterias exhiben una amplia diversidad morfológica, encontrándose desde formas unicelulares, alargadas o esféricas, hasta formas filamentosas con distinto grado de complejidad. No es sorprendente que debido a su gran variedad morfológica, las clasificaciones taxonómicas tradicionales se basaran en criterios morfológicos y de división celular, agrupando las distintas especies en cinco secciones (Figura 1.1) (Rippka *et al.*, 1979). La Sección I (Chroococcales), a la que pertenecen géneros como *Synechococcus* o *Synechocystis*, comprende las cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación. La Sección II (Pleurocapsales) la constituyen cianobacterias unicelulares capaces de dividirse por fisión múltiple y/o binaria, como las de los géneros *Pleurocapsa* o *Dermocarpa*. En la Sección III (Oscillatoriales) se agrupan las estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, como las de los géneros *Plectonema* y *Spirulina*. En la Sección IV (Nostocales), a la que pertenecen géneros como *Anabaena* o *Nostoc*, se engloban las cianobacterias filamentosas que se dividen en un solo plano y presentan la capacidad de diferenciar heterocistos a partir de células vegetativas. La Sección V (Stigonematales) incluye estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en más de un plano, dando lugar a una organización multicelular más compleja con filamentos con ramificaciones auténticas, como las de los géneros *Fischerella* o *Scytonema*.

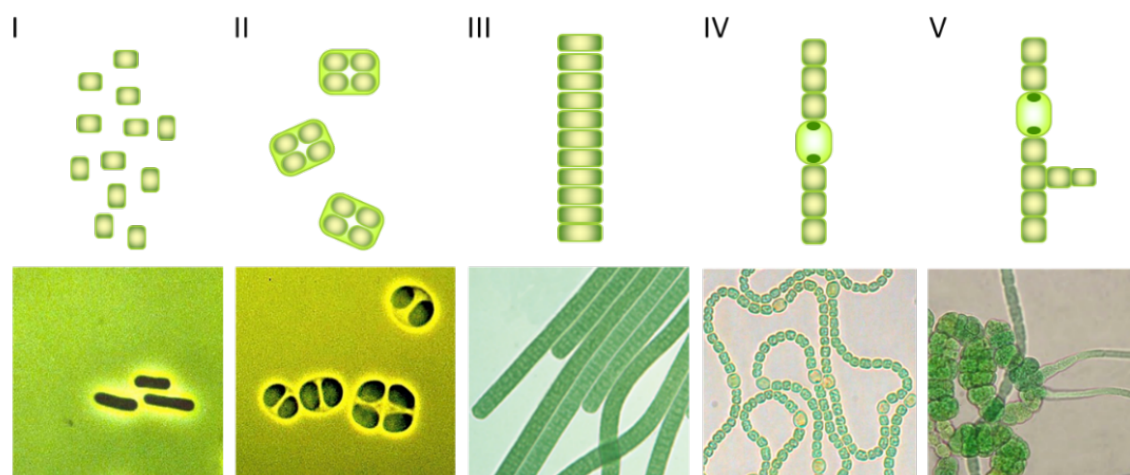


Figura 1.1. Estirpes de cianobacterias representativas de las secciones establecidas en la clasificación morfológica de (Rippka *et al.*, 1979). Los números romanos indican la sección taxonómica a la que representan. (I) Chroococcales; (II) Pleurocapsales; (III) Oscillatoriales; (IV) Nostocales; (V): Stigonematales. Las imágenes son cortesía de A. M. Muro Pastor (I, II), J. E. Frías, Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja) (III, V), y E. Olmedo-Verd (IV).

Aunque este sistema de clasificación morfológica sigue teniendo cierta utilidad, las clasificaciones más recientes están basadas en métodos de filogenia molecular. Los análisis moleculares han demostrado que la clasificación morfológica no es fiel a la filogenia (Giovannoni *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1999; Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005; Tomitani *et al.*, 2006), y sólo aquellos grupos que llevan a cabo la diferenciación celular (Secciones IV y V) son filogenéticamente coherentes (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2013; Schirrmeister *et al.*, 2015). El árbol filogenético utilizado en esta Tesis Doctoral es el propuesto por (Shih *et al.*, 2013) (Figura 1.2). Según este análisis filogenético únicamente el grupo de las cianobacterias formadoras de heterocistos, pertenecientes a las Secciones IV y V de Rippka, son morfológica y genómicamente coherentes entre ellas, formando un clado consistente con un origen monofilético. Sin embargo, el resto de grupos morfológicos se encuentran distribuidos de forma dispersa a lo largo del árbol. De este modo, este estudio manifiesta que tanto la capacidad de formar filamentos, como la división celular en varios planos, han aparecido en múltiples momentos independientes a lo largo de la evolución de las cianobacterias. Además, algunas especies unicelulares parecen ser el resultado de la pérdida de la capacidad de formar filamentos (Shih *et al.*, 2013).

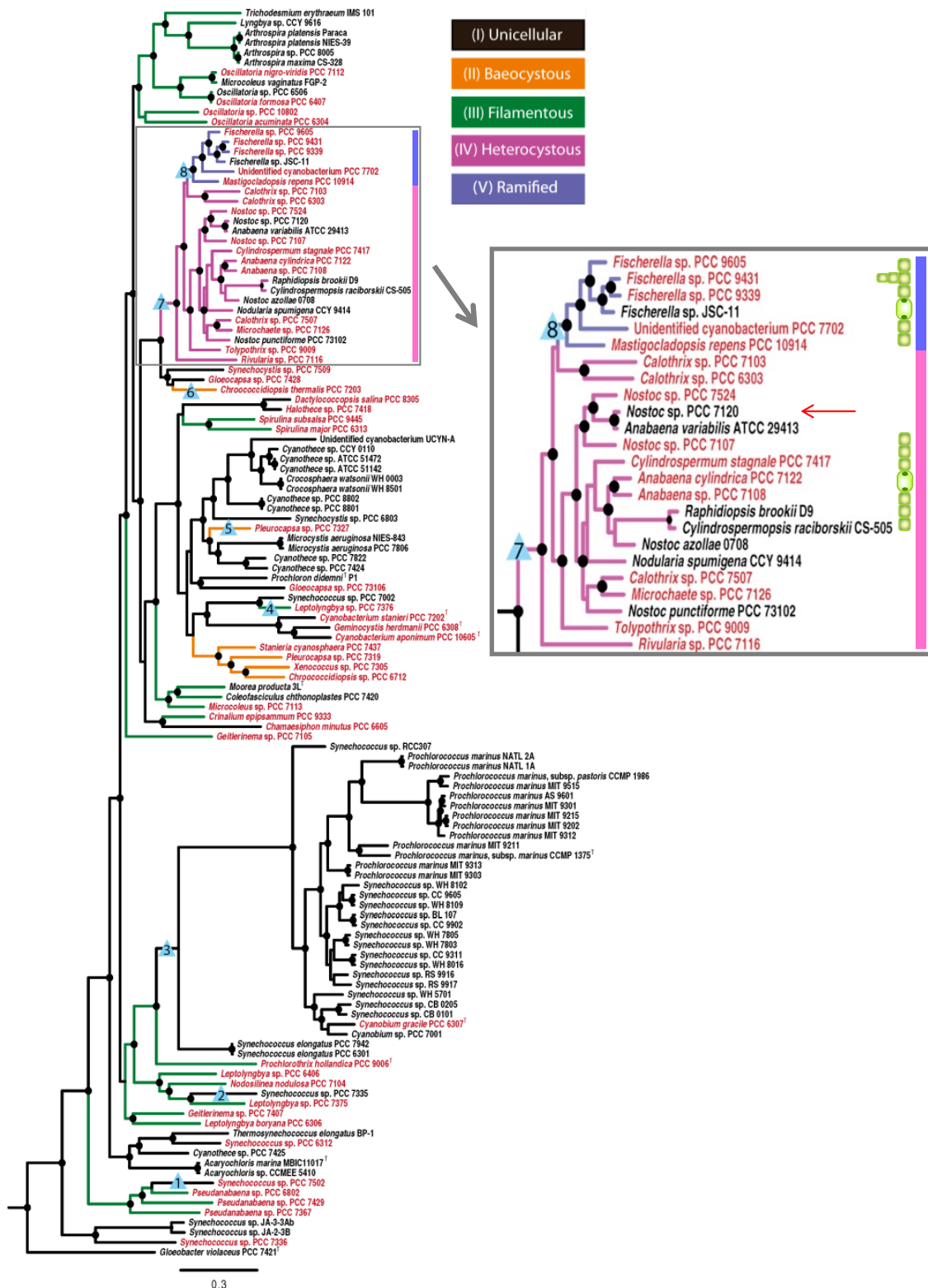


Figura 1.2. Árbol filogenético de las cianobacterias según (Shih *et al.*, 2013). Cada rama horizontal del árbol aparece coloreada según la sección a la que pertenece en la clasificación morfológica de (Rippka *et al.*, 1979), de acuerdo con el código de colores que se indica arriba a la derecha del árbol. La ampliación del árbol enmarcada en gris contiene las estirpes formadoras de heterocistos. La flecha roja indica el organismo de referencia utilizado en este trabajo, *Nostoc* sp. PCC 7120. La imagen, adaptada de (Shih *et al.*, 2013), muestra en rojo las especies cuyo genoma se secuenció en el marco de dicho trabajo, y con triángulos azules las transiciones morfológicas investigadas en el mismo.

En la evolución de las cianobacterias se observa un paralelismo entre el aumento en la complejidad fisiológica y el incremento en la complejidad genómica. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de un grupo de genes, a los que se hace referencia como *core*, que están altamente conservados en todas las cianobacterias, y que contiene genes para la formación de la maquinaria fotosintética y los ribosomas, así como genes cuyos productos están implicados en la síntesis de ATP, en la síntesis de clorofila, o en el ciclo de Calvin. Otros genes específicos de algunos géneros y especies se han adquirido principalmente por transferencia horizontal o por fenómenos de duplicación y deriva génica (Shi y Falkowski, 2008). Así, la heterogeneidad de las cianobacterias también se refleja en la diversidad genómica entre las distintas especies. El rango de contenido en G+C de las diferentes estirpes varía entre el 32% y el 71%, cercano al rango de valores encontrado en los procariotas en su conjunto (Herdman *et al.*, 1979). El tamaño de los genomas cianobacterianos oscila entre las 1,66 Mb de *Prochlorococcus* MED4, considerado el tamaño mínimo requerido para un organismo fotosintético de vida libre (Rocap *et al.*, 2003), y las 9,2 Mb de *Nostoc punctiforme*. Igualmente, existe una amplia variabilidad en la organización genómica, encontrándose especies como *Gloeobacter violaceus*, o las cianobacterias de los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* marinos, que poseen un único cromosoma circular, mientras que en otras especies el contenido genómico se distribuye en un cromosoma circular y varios plásmidos de tamaño variable (Hess, 2011). En cuanto al número de copias del cromosoma, existen especies monoploides, oligoploides y poliploides, con hasta 100 copias del cromosoma por célula (Griese *et al.*, 2011).

Un aspecto de la biología de las cianobacterias que resulta del máximo interés es la capacidad de diferenciación celular. Algunas estirpes de cianobacterias filamentosas son capaces de desarrollar células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico, denominadas heterocistos, y/o células de resistencia denominadas akinetos. Además, algunas especies de cianobacterias filamentosas pueden diferenciar hormogonios, pequeños filamentos móviles distinguibles del filamento vegetativo que están implicados en la dispersión del organismo y en el establecimiento de relaciones simbióticas (Flores y Herrero, 2010).

La cianobacteria utilizada como organismo modelo en esta Tesis Doctoral ha sido *Nostoc* sp. PCC 7120 (= *Anabaena* sp. PCC 7120), una estirpe filamentosa que, en condiciones de deficiencia en nitrógeno combinado, es capaz de diferenciar heterocistos (Muro-Pastor y Hess, 2012). El genoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 consta de 7,2 Mb distribuidas entre un cromosoma circular de 6,4 Mb, y 6 plásmidos de entre 408 kb y 5,5 kb, denominados de mayor a menor tamaño como α , β , γ , δ , ϵ y ζ (Kaneko *et al.*, 2001).

1.1.2. Aspectos metabólicos de las cianobacterias

En contraste con su diversidad morfológica, las cianobacterias constituyen un grupo de organismos muy homogéneo desde el punto de vista de su metabolismo, que se caracteriza por la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica, aunque algunas especies, como *Oscillatoria limnetica*, en determinadas condiciones, pueden llevar a cabo una fotosíntesis anoxigénica, oxidando SH_2 y liberando S . Aunque generalmente las cianobacterias se han considerado bacterias autótrofas estrictas, algunas cianobacterias también son capaces de asimilar fuentes reducidas de carbono (Rippka, 1972), como la sacarosa, glucosa o fructosa, necesitando o no iluminación para ello. Esta capacidad depende, al menos en parte, de la existencia en estas cianobacterias de transportadores o permeasas específicas que facilitan la entrada de los azúcares en la célula (Ungerer *et al.*, 2008). Así, además del metabolismo foto-lito-autótrofo de todas las cianobacterias, en la actualidad se conocen numerosos ejemplos de cianobacterias capaces de llevar a cabo un metabolismo foto-químico-heterótrofo, químico-heterótrofo e incluso mixótrofo (Stebegg *et al.*, 2012; Muñoz-Marín *et al.*, 2013).

La fijación de carbono tiene lugar mediante la vía reductiva de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin-Benson. Parte del CO_2 fijado se acumula en forma de glucógeno como material de reserva que se utiliza en los períodos de oscuridad, cuando no tiene lugar la fotosíntesis. Para el metabolismo respiratorio, que se realiza principalmente en condiciones de oscuridad, las cianobacterias utilizan la vía oxidativa de las pentosas fosfato. En el metabolismo respiratorio, la cadena de transporte respiratoria comparte parte de sus componentes con la cadena de transporte de electrones fotosintética (Schmetterer, 1994).

Se ha considerado que las cianobacterias presentaban un ciclo de Krebs incompleto al carecer de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). De este modo, estaba bien establecido que el ciclo de Krebs de las cianobacterias tenía una función anabólica, suministrando el 2-oxoglutarato necesario para la incorporación del nitrógeno inorgánico en esqueletos carbonados (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), la síntesis de aminoácidos de la familia del glutamato, y la síntesis de δ -aminolevulinato, un precursor inmediato para la síntesis de porfirinas, ficobilinas y clorofila (Beale, 1994). No obstante, estudios recientes sugieren la existencia de rutas alternativas que completarían el ciclo de Krebs en cianobacterias (Zhang y Bryant, 2011; Xiong *et al.*, 2014).

1.1.2.1. Asimilación de carbono en cianobacterias: la fotosíntesis oxigénica

Como se ha mencionado, la característica más relevante de las cianobacterias es su capacidad de emplear energía lumínica para fijar CO_2 mediante fotosíntesis. Las cianobacterias fueron los primeros organismos en utilizar dos fotosistemas en serie, lo cual les permitió generar el potencial electroquímico suficiente para utilizar agua como donador de electrones, produciendo oxígeno como subproducto de la fotosíntesis (Hohmann-Marriott y Blankenship, 2011). En la Biosfera actual, realizan la fotosíntesis oxigénica las cianobacterias, algas y plantas superiores. En todos estos organismos, el proceso fotosintético ocurre, en esencia, del mismo modo, aunque las cianobacterias cuentan con algunas características particulares. Como ya se ha mencionado, una de estas características radica en la composición del aparato fotosintético, pues cuentan con ficobilisomas asociados a las membranas tilacoidales. Los ficobilisomas son macrocomplejos compuestos mayoritariamente de ficobiliproteínas, pigmentos antena cuya función consiste en captar la luz y transferir la energía lumínica a los fotosistemas I y II (Bailey y Grossman, 2008; Liu *et al.*, 2013). Las ficobiliproteínas pueden llegar a representar el 40-50% de la proteína celular, por lo que constituyen importantes reservas de nitrógeno y carbono. Otra singularidad de las cianobacterias es la capacidad de adaptar la composición de su aparato fotosintético a las condiciones lumínicas mediante un proceso denominado fotomorfogénesis. Este proceso engloba distintos fenómenos que permiten a las cianobacterias regular la cantidad de clorofila y la proporción entre los fotosistemas I y II, o modificar la composición de pigmentos de los ficobilisomas en función de la longitud de onda o de la intensidad de la luz. Este último fenómeno se conoce como “adaptación cromática” (Gutu y Kehoe, 2012; Montgomery, 2016).

Durante la fotosíntesis, la enzima responsable de la fijación de CO_2 es la RuBisCO (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), considerada la enzima más abundante en la Tierra. La RuBisCO es una enzima bifuncional que puede usar CO_2 (carboxilasa) u O_2 (oxigenasa) como sustrato. Como carboxilasa, la RuBisCO cataliza el primer paso del ciclo de Calvin-Benson, esto es, la incorporación del CO_2 a la molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato para generar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Este fotosintato sigue reduciéndose hasta dar lugar a azúcares que sirven a la cianobacteria como esqueletos carbonados en sus procesos de biosíntesis. Sin embargo, la RuBisCO presenta mayor afinidad por el O_2 que por el CO_2 , de forma que, como oxigenasa, puede catalizar la incorporación de una molécula de O_2 a la ribulosa 1,5-bisfosfato para generar 2-fosfoglicolato. Este compuesto se metaboliza por fotorrespiración empleando grandes cantidades de energía y liberando CO_2 , lo que reduce de forma significativa la eficiencia de la fotosíntesis (Kroth, 2015). La concentración de O_2 en la atmósfera es muy superior a la

Introducción

de CO₂. Además, durante la fotosíntesis las cianobacterias generan O₂. Este ambiente aeróbico favorecería la actividad oxigenasa de la RuBisCO, con la consiguiente pérdida de eficacia. Para solventar este problema e incrementar la eficiencia de la fijación de CO₂, las cianobacterias han desarrollado distintos sistemas de concentración de CO₂ en las inmediaciones de la RuBisCO (Burnap *et al.*, 2015). Estos mecanismos, denominados CCM (CO₂ Concentrating Mechanism) son tres: la existencia de transportadores de CO₂ y HCO₃⁻, que llegan a concentrar hasta 1.000 veces los niveles de carbono inorgánico en el citosol (Kaplan y Reinhold, 1999; Giordano *et al.*, 2005); la actividad de las anhidrasas carbónicas, que catalizan la interconversión de HCO₃⁻ y CO₂; y el confinamiento de la RuBisCO y la anhidrasa carbónica en el carboxisoma (Kerfeld y Melnicki, 2016).

El carbono inorgánico resulta ser limitante en la mayoría de los ambientes habitados por las cianobacterias. En estas condiciones, se inducen genes de los sistemas CCM y de las proteínas estructurales de la RuBisCO (Price *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2018). En *Synechocystis* PCC 6803, los elementos del CCM están principalmente bajo el control de dos reguladores de la transcripción de tipo LysR (LTTR), la proteína CmpR, y el regulador NdhR (Jiang *et al.*, 2018). En condiciones de limitación de carbono inorgánico, la proteína CmpR actúa como un activador transcripcional de la expresión del operón *cmp*, que codifica las subunidades de un transportador de HCO₃⁻ tipo ABC (Omata *et al.*, 2001). En contraste, y a pesar de compartir una identidad de secuencia del 54% con CmpR, en estas condiciones NdhR funciona como un represor transcripcional para controlar globalmente la expresión de varios genes relacionados con el CCM, como los sistemas *ndh*, que codifican las proteínas del sistema de captación de alta afinidad de CO₂ (Wang *et al.*, 2004). Este mecanismo también ha sido descrito en *Nostoc* sp. PCC 7120 (López-Igual *et al.*, 2012), donde la expresión de la agrupación génica *alr2877-alr2880*, que codifica el sistema de transporte de HCO₃⁻ tipo ABC Cmp, se induce en condiciones de limitación de carbono inorgánico. Además, el gen *all0862*, que codifica un regulador transcripcional de tipo LysR, también se expresa bajo condiciones de limitación de carbono inorgánico y en unos niveles más elevados en ausencia que en presencia de nitrógeno combinado, con un efecto positivo del factor de transcripción NtcA, el regulador global de la asimilación de nitrógeno en cianobacterias. De este modo, la proteína All0862 es requerida para la inducción del transportador Cmp de HCO₃⁻, representando así un regulador CmpR en *Nostoc* sp. PCC 7120. Este sistema supone un nuevo modo de coregulación por la disponibilidad de C y N a través de la acción concertada de los factores de transcripción que responden a estos nutrientes. Además, recientemente se ha caracterizado la proteína PacR como el regulador global de la asimilación fotosintética de carbono en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Picossi *et al.*, 2015).

Dependiendo de la disponibilidad de carbono inorgánico, este factor de transcripción tipo LysR regula la expresión de genes que codifican las subunidades de la RuBisCO, transportadores Ndh, transportadores de HCO_3^- , y otras proteínas implicadas en los mecanismos CCM. Asimismo, PacR participa en la regulación de la expresión de proteínas de los fotosistemas, así como de proteínas involucradas en la defensa del aparato fotosintético frente a daños oxidativos (Picossi *et al.*, 2015; Herrero y Flores, 2019).

El carbono y el nitrógeno son los nutrientes más abundantes en los organismos vivos. Por lo tanto, los metabolismos del carbono y el nitrógeno, que son esenciales para que las bacterias se adapten a las variaciones nutricionales del medio ambiente, deben estar estrechamente controlados (Jiang *et al.*, 2018). En microorganismos autótrofos como las cianobacterias, el control del metabolismo del carbono es particularmente importante debido a las limitadas fuentes de carbono disponibles para mantener el ritmo de la asimilación del nitrógeno (Jiang *et al.*, 2018). Como se ha mencionado, los niveles elevados de CO_2 favorecen la actividad carboxilasa de la RuBisCO, generando 3-fosfoglicerato, mientras que los niveles altos de O_2 , o bajos de CO_2 , promueven la actividad oxigenasa, produciendo 2-fosfoglicolato. Así, el nivel de 2-fosfoglicolato se correlaciona de manera inversa con el de 2-oxoglutarato, que se acumula bajo una alta ratio C/N, y actúa como una señal de limitación de nitrógeno en el medio (Forchhammer, 2004; Herrero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2018). De este modo, estos dos metabolitos, que funcionan juntos como indicadores del estado intracelular C/N, representan un sensor fino para la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno en las cianobacterias (Jiang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

1.1.2.2. Asimilación de nitrógeno en cianobacterias

Las cianobacterias son capaces de utilizar diversas fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno, tales como amonio, nitrato, nitrito, urea, algunos aminoácidos como la glutamina y la arginina, y bases nitrogenadas (Flores y Herrero, 1994). Existe una jerarquía a la hora de emplear las distintas fuentes inorgánicas de nitrógeno, de manera que se utilizan preferentemente aquellas que implican un menor consumo energético. El mecanismo regulatorio mediante el cual las cianobacterias utilizan una ruta de asimilación de nitrógeno en detrimento de otras más costosas energéticamente recibe el nombre de “control por nitrógeno”, y consiste en la represión de las vías de asimilación de algunas fuentes de nitrógeno cuando otras, más fácilmente asimilables, están disponibles para las células (Herrero *et al.*, 2001; Herrero y Flores, 2019).

Introducción

El control por nitrógeno en cianobacterias está mediado por la proteína NtcA, un regulador transcripcional que activa o reprime genes implicados en la asimilación de nitrógeno en función de la disponibilidad de N. La fuente preferencial de nitrógeno, más fácilmente asimilable por las cianobacterias, es el amonio (Herrero *et al.*, 2001; Herrero y Flores, 2019). Así, en presencia de concentraciones no limitantes de amonio los sistemas de transporte y asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas, como por ejemplo el nitrato, se mantienen reprimidos. Por el contrario, en ausencia de amonio, NtcA promueve la expresión de transportadores y enzimas de rutas de asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno. La asimilación de estas sustancias requiere su incorporación al interior celular y su posterior metabolización para generar amonio, que se incorpora a esqueletos carbonados para dar lugar a compuestos nitrogenados orgánicos. La incorporación del amonio a esqueletos carbonados se realiza fundamentalmente mediante el ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa, GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1978; Flores y Herrero, 1994), el cual constituye la conexión entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Zhang *et al.*, 2018). El primer paso del ciclo GS-GOGAT lo realiza la enzima glutamina sintetasa (GS), que cataliza la síntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de amonio y glutamato. El segundo paso es llevado a cabo por la enzima glutamato sintasa (GOGAT), que cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina a una molécula de 2-oxoglutarato, produciéndose dos moléculas de glutamato, en una reacción que requiere poder reductor (van den Heuvel *et al.*, 2004). Una de las moléculas de glutamato se recicla para la síntesis de glutamina. A diferencia de la GS, que está fuertemente regulada a nivel de expresión y actividad, y que se encuentra en todas las células de los filamentos, la enzima GOGAT no está regulada por la fuente de nitrógeno y no está presente en los heterocistos (Thomas *et al.*, 1977; Martín-Figueroa *et al.*, 2000).

Como ya se ha mencionado, la regulación global de la asimilación de nitrógeno en cianobacterias está controlada a nivel transcripcional por NtcA, un factor de transcripción de la familia CRP/FNR, también necesario para que tenga lugar el proceso de diferenciación de los heterocistos (véase apartado 1.1.2.3.2) (Herrero *et al.*, 2001). La actividad de NtcA está modulada por la cantidad de 2-oxoglutarato, que refleja el estado nitrogenado de las células (Muro-Pastor *et al.*, 2001). En presencia de nitrógeno combinado el nivel de 2-oxoglutarato es bajo, y NtcA tiene baja afinidad por los promotores que regula. Los niveles elevados de 2-oxoglutarato que se acumulan en condiciones de limitación de nitrógeno estimulan la unión de NtcA a las regiones promotoras de los genes que regula (Zhao *et al.*, 2010). Esta regulación tiene lugar mediante la unión de NtcA a secuencias específicas conservadas en dichos promotores. La secuencia de unión de NtcA, inicialmente definida como GTAN₈TAC en

base a unos pocos promotores (Luque *et al.*, 1994), se ha redefinido como GTN₁₀AC tras acercamientos que analizan globalmente todos los promotores regulados por este factor de transcripción (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014; Giner-Lamia *et al.*, 2017). Se ha descrito que NtcA puede actuar como un activador o como un represor de la transcripción dependiendo de la ubicación del sitio de unión con respecto al sitio de inicio de la transcripción regulado (TSS, *Transcription Start Site*) (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014). La mayoría de los promotores activados por NtcA contienen un sitio de unión de NtcA centrado alrededor de la posición -41,5 con respecto al TSS, similar a la posición de los sitios de unión de CRP en promotores activados de Clase II (Herrero *et al.*, 2001; Browning y Busby, 2004). Por el contrario, los genes reprimidos por NtcA presentan sitios de unión de NtcA que pueden solapar con alguno de los elementos críticos del promotor, como la caja -35, la caja -10 o el TSS, interfiriendo de esta forma en la unión de la RNA polimerasa al mismo (Herrero *et al.*, 2001).

En el contexto de la regulación del metabolismo del nitrógeno, las cianobacterias cuentan con mecanismos que modulan la actividad de NtcA, como el sistema conformado por la proteína transductora de señales P_{II}, y la proteína de unión a P_{II}, PipX (*P_{II} interacting protein X*). La proteína P_{II}, muy extendida en bacterias, algas y plantas, transmite señales de abundancia o escasez de carbono, energía y disponibilidad de nitrógeno, convirtiendo estas señales en cambios en la expresión génica, o en las actividades de transportadores o enzimas (Forcada-Nadal *et al.*, 2018). Esta proteína, que fue la primera proteína reconocida como un sensor de los niveles de 2-oxoglutarato en *Escherichia coli* (Adler *et al.*, 1975), actúa interaccionando con distintas dianas proteicas, activando o reprimiendo algunos procesos en función del estado nitrogenado celular. En cianobacterias se han identificado tres procesos en los que P_{II} actuaría como regulador: el transporte de nitrato y nitrito, la biosíntesis de arginina, y la expresión de genes dependientes de NtcA (Luque y Forchhammer, 2008). Al contrario que P_{II}, PipX está presente exclusivamente en cianobacterias (Espinosa *et al.*, 2006), y fue identificada inicialmente como una proteína que interacciona con P_{II}, aunque posteriormente, se demostró además su interacción con NtcA de forma dependiente de 2-oxoglutarato (Espinosa *et al.*, 2006). En *Nostoc* sp. PCC 7120, el gen *pipX* (*asr0485*) se expresa principalmente en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, y no solo requiere NtcA, sino también HetR, el regulador específico de la diferenciación celular (véase apartado 1.1.2.3.2). Se ha demostrado que PipX contribuye a la correcta función del heterocisto, incluyendo la activación completa de los genes estructurales de la nitrogenasa, y de los genes encargados de proteger a la nitrogenasa frente al oxígeno (Valladares *et al.*, 2011; Herrero y Flores, 2019). De este modo, la compleja red de interacción entre NtcA y las proteínas P_{II} y PipX es clave en la regulación del

Introducción

metabolismo del nitrógeno. En condiciones de limitación de nitrógeno, los niveles elevados de 2-oxoglutarato estimulan la acción de NtcA y PipX. Éste último se une a NtcA estabilizando su conformación activa, actuando por tanto como un coactivador (Espinosa *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2018). Además, PipX cuenta con un sitio de unión para P_{II}, pero, mientras que el complejo PipX-NtcA es estabilizado a elevadas concentraciones de 2-oxoglutarato, la interacción entre PipX- P_{II} se ve reducida en presencia de 2-oxoglutarato, de manera que PipX se une a P_{II} cuando los niveles de 2-oxoglutarato son bajos, es decir, en condiciones de suficiencia de nitrógeno. Cuando se produce esta unión, P_{II} secuestra a PipX, impidiendo su unión a NtcA, y evitando así su activación. Por su parte, P_{II} también une 2-oxoglutarato, lo que genera un cambio conformacional que impide su unión a PipX, por lo que PipX estaría libre para unirse a NtcA e incrementar su actividad en condiciones de limitación de nitrógeno (Espinosa *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2018). De esta forma, el 2-oxoglutarato actúa a varios niveles, incrementando así la respuesta mediada por NtcA. Esto sugiere un modelo en el cual PipX se une a P_{II} en condiciones de suficiencia de nitrógeno, y por tanto bajos niveles de 2-oxoglutarato, y coactiva a NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno, cuando los niveles de 2-oxoglutarato son elevados (Forcada-Nadal *et al.*, 2018).

1.1.2.3. Adaptación de *Nostoc* sp. PCC 7120 a la carencia de nitrógeno combinado

La adaptación de las cianobacterias a la carencia de nitrógeno combinado implica la activación de un programa transcripcional encaminado a la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno, incluyendo la degradación de complejos proteicos para la reutilización de los aminoácidos. Además, en el caso de numerosas cianobacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico mediante la enzima nitrogenasa, se inicia la diferenciación de un tipo celular especializado, los heterocistos, en los que se genera una atmósfera microaeróbica apropiada para el funcionamiento de dicha enzima. Todos estos procesos están en última instancia bajo el control del regulador global NtcA, si bien implican también el concurso de algunos reguladores específicos. Se describen a continuación con más detalle algunos aspectos de estos fenómenos de adaptación que son relevantes en el contexto de este trabajo.

1.1.2.3.1. Degradación de los ficobilisomas. Papel de NblA

Las cianobacterias no diazotróficas responden al estrés nutricional por déficit de nitrógeno mediante un proceso llamado clorosis (o *bleaching*), que implica la degradación de los pigmentos fotosintéticos, incluidos los ficobilisomas (Grossman *et al.*, 1993a; 1993b). En cianobacterias unicelulares el proceso de clorosis es una respuesta frente a diferentes estreses, que en algunas especies como *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, incluyen además de la deficiencia de nitrógeno la carencia de azufre (Collier y Grossman, 1992). La degradación de los ficobilisomas, además de proteger el aparato fotosintético en condiciones de exposición a alta luz, también proporciona aminoácidos como fuente de nitrógeno en situaciones de deficiencia de nitrógeno combinado. De este modo, las cianobacterias responden a la situación de carencia de nitrógeno combinado activando la degradación de proteínas (Fleming y Haselkorn, 1974) por la acción de enzimas proteolíticas (Wood y Haselkorn, 1976). Esta respuesta supone la movilización en todas las células vegetativas de los productos nitrogenados de almacenamiento, como son los gránulos de cianoficina (Lang *et al.*, 1972) y las ficobiliproteínas (Glazer, 1987). Mientras que las ficobiliproteínas son, como se ha mencionado anteriormente, pigmentos fotosintéticos de naturaleza proteica, la cianoficina (multi-L-arginil-poli-L-aspartato) es un polímero de almacenamiento sintetizado no ribosómicamente.

La proteína NblA (*non-bleaching phenotype A*) funciona como un adaptador implicado en el proceso de degradación de los ficobilisomas, facilitando la interacción del ficobilisoma con el complejo proteolítico encargado de su degradación en diferentes situaciones de estrés (Collier y Grossman, 1994; Karradt *et al.*, 2008; Sendersky *et al.*, 2014). En *Nostoc* sp. PCC 7120 se ha demostrado que el gen *nblA* tiene varios promotores y está sujeto tanto a regulación a través de NtcA, que incluye la inducción de su transcripción en condiciones de carencia de nitrógeno combinado (Mitschke *et al.*, 2011b), como a una regulación por FurA en condiciones de deficiencia de hierro (González *et al.*, 2016). Aunque las cianobacterias formadoras de heterocistos sean capaces, en última instancia, de revertir la situación de deficiencia de nitrógeno mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, su respuesta transitoria a la situación de carencia de nitrógeno combinado también incluye, como ya se ha comentado, la inducción del gen *nblA* y la degradación parcial de los ficobilisomas (Baier *et al.*, 2004).

Introducción

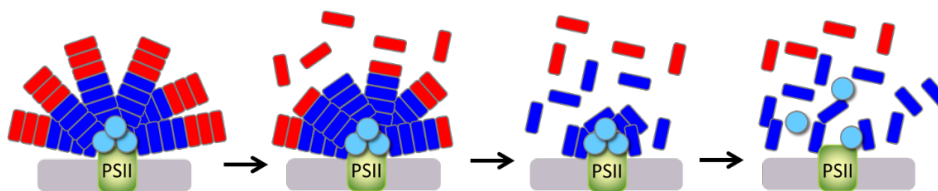


Figura 1.3. Representación esquemática de la degradación de los ficobilisomas durante la deficiencia de nitrógeno combinado. Los ficobilisomas se muestran anclados a la membrana tilacoidal (gris), asociados al fotosistema II (PSII, verde). El proceso de degradación es secuencial, comenzando con la pérdida de los cilindros periféricos de ficoeritrina (rectángulos rojos) y ficocianina (rectángulos azules), y concluyendo con la degradación del núcleo de aloficocianina (círculos celestes). Imagen adaptada de (Grossman *et al.*, 1993b). Los ficobilisomas de *Nostoc* sp. PCC 7120 están compuestos por 8 cilindros periféricos de ficocianina (Magnuson y Cardona, 2016) y no tienen ficoeritrina, que se representa en este esquema por estar presente en otras cianobacterias formadoras de heterocistos. Sólo se representan seis cilindros por claridad.

El proceso de degradación de los ficobilisomas es secuencial, comenzando con la pérdida de los cilindros compuestos por ficoeritrina y ficocianina, y concluyendo con la degradación del núcleo de aloficocianina (Figura 1.3) (Yamanaka y Glazer, 1980; Collier y Grossman, 1992). En *Nostoc* sp. PCC 7120, el gen *nblA* codifica una proteína dimérica pequeña, de 7 kDa y 65 aminoácidos, que presenta una identidad relativamente baja, aproximadamente del 30%, con la de otras cianobacterias. No obstante, la estructura de NblA sí está muy conservada en todas las cianobacterias (Bienert *et al.*, 2006). La proteína NblA consta de una región N-terminal y de una región C-terminal muy conservadas, que juegan un papel clave en el proceso de degradación de los ficobilisomas. El modelo más aceptado de la degradación de los ficobilisomas propone la participación conjunta de NblA, la chaperona ClpC, y la proteasa cianobacteriana Clp. Así, los residuos conservados en la región N-terminal de NblA intervienen en la unión con ClpC (Karradt *et al.*, 2008), mientras que la región C-terminal se une específicamente a las subunidades alfa de la ficoeritrina y ficocianina de los ficobilisomas (Bienert *et al.*, 2006). De este modo, NblA forma un complejo ternario *in vivo* con la chaperona ClpC y los ficobilisomas (Karradt *et al.*, 2008). La proteína ClpC es una chaperona dependiente de ATP de la familia HSP100 (*Heat Shock Protein*). Esta chaperona es responsable del reconocimiento, despliegue y translocación del sustrato (ficobiliproteínas) a la proteasa Clp, encargada en última instancia de la degradación de los ficobilisomas (Karradt *et al.*, 2008). La especificidad del sustrato puede producirse mediante la unión de la proteasa Clp a la chaperona, o como en este caso en particular, por la unión simultánea de una proteína adaptadora (NblA) al sustrato y a la chaperona. Por lo tanto, NblA modula la especificidad de la proteasa por el sustrato (ficobiliproteínas), permitiendo la degradación de éstas a la velocidad adecuada. Dicho de otro modo, NblA funciona como un adaptador de la chaperona ClpC, que guía la proteasa Clp a los ficobilisomas. Así, la regulación de los niveles de NblA constituye un mecanismo rápido y efectivo para controlar la degradación de ficobiliproteínas por la proteasa Clp sin afectar al resto de sus actividades, significando esto que la degradación de los ficobilisomas está exclusivamente regulada por la expresión de *nblA* (Karradt *et al.*, 2008).

1.1.2.3.2. Diferenciación celular: el heterocisto

En ausencia de nitrógeno combinado, algunas cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico a través de la enzima nitrogenasa, un complejo multiproteico que cataliza la reducción de N_2 hasta amonio en una reacción muy costosa energéticamente (Seefeldt *et al.*, 2009). La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, por lo que la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica son dos procesos incompatibles. Las cianobacterias han desarrollado distintas estrategias para proteger la maquinaria de fijación de nitrógeno frente al oxígeno (Fay, 1992; Flores y Herrero, 1994). La estrategia más común en las cianobacterias no formadoras de heterocistos es la separación temporal de los dos procesos, realizando la fotosíntesis oxigénica durante las horas de luz, y la fijación de nitrógeno atmosférico en oscuridad (Huang *et al.*, 1999; Reade *et al.*, 1999; Misra y Tuli, 2000). Por su parte, las cianobacterias formadoras de heterocistos llevan a cabo una separación espacial de ambos procesos mediante la diferenciación, a partir de células vegetativas, de células terminalmente diferenciadas denominadas heterocistos, en las que tiene lugar la fijación de nitrógeno, dando lugar a un organismo multicelular compuesto por dos tipos celulares interdependientes. De este modo, cada proceso queda confinado en un tipo celular, la fotosíntesis oxigénica en las células vegetativas, y la fijación de nitrógeno en los heterocistos (Figura 1.4) (Muro-Pastor y Hess, 2012).

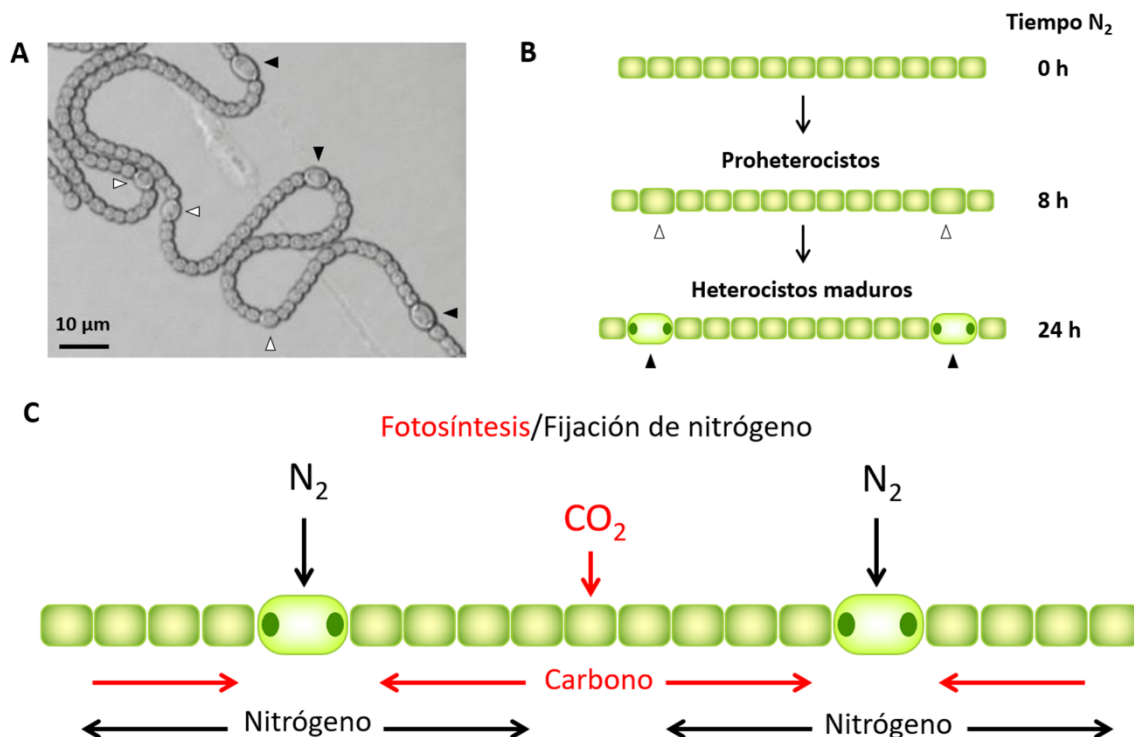


Figura 1.4. Diferenciación de heterocistos y relaciones funcionales entre heterocistos y células vegetativas. (A) Los filamentos creciendo a expensas de nitrógeno atmosférico diferencian nuevos heterocistos (triángulos blancos) entre heterocistos maduros preexistentes (triángulos negros) en un proceso que se completa en unas 24 horas (B). (C) Relaciones funcionales entre los heterocistos (fijadores de nitrógeno) y las células vegetativas (que realizan la fotosíntesis oxigénica). Imagen adaptada de (Muro-Pastor y Hess, 2012).

Introducción

Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno que presentan una estructura y fisiología específicas para la creación y el mantenimiento de un ambiente microaeróbico óptimo para el funcionamiento de la nitrogenasa. En *Nostoc* sp. PCC 7120 se establece un patrón unidimensional en el que los heterocistos se diferencian de forma regular, cada 10-15 células vegetativas a lo largo del filamento (Herrero *et al.*, 2004; Flores y Herrero, 2010). Este patrón se mantiene durante el crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico mediante la diferenciación de nuevos heterocistos aproximadamente en un punto equidistante entre dos heterocistos ya existentes.

El proceso de diferenciación y el subsiguiente crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico implican fenómenos regulatorios complejos que dependen de programas transcripcionales exclusivos de cada tipo celular. De este modo, la diferenciación de heterocistos supone el establecimiento de un crecimiento multicelular con división de tareas, en el que dos tipos celulares diferentes con capacidades metabólicas complementarias funcionan de forma coordinada. La activación del programa génico que conduce a la diferenciación del heterocisto se da exclusivamente en aquellas células del filamento que van a diferenciarse. El proceso de diferenciación está orquestado por el regulador global de la asimilación de nitrógeno, NtcA (Herrero *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2004), y por HetR, un regulador específicamente implicado en la diferenciación celular (Buikema y Haselkorn, 1991; Black *et al.*, 1993). En este contexto, *ntcA* y *hetR* presentan una dependencia mutua en la activación de su expresión (Muro-Pastor *et al.*, 2002), mostrando ambos genes un aumento de la transcripción en los heterocistos en desarrollo (Black *et al.*, 1993; Olmedo-Verd *et al.*, 2006). La inducción de la transcripción de *hetR* específicamente en ciertas células del filamento precede al incremento de la expresión de *ntcA* en estas células que van a diferenciarse, y ambos genes se autorregulan positivamente (Muro-Pastor *et al.*, 2002). La acción de NtcA no sólo es requerida durante la diferenciación, sino también para el correcto funcionamiento del heterocisto maduro. Este requerimiento se debe al papel de NtcA como activador transcripcional de genes que codifican proteínas estructurales o reguladoras que participan en la diferenciación o en el metabolismo del heterocisto (Flores *et al.*, 2018).

El programa de expresión génica diferencial entre células vegetativas y heterocistos tiene consecuencias fisiológicas y estructurales. Desde el punto de vista metabólico, cada tipo celular lleva a cabo procesos distintos (Flores *et al.*, 2018). Como se ha mencionado, las células vegetativas son las responsables de realizar la fotosíntesis oxigénica, y los heterocistos los encargados de la fijación de nitrógeno atmosférico. Los heterocistos no tienen la capacidad de fijación fotosintética de CO₂ al no tener un fotosistema II funcional (Donze *et al.*, 1972; Magnuson, 2019) y al carecer de RuBisCO (Winkenbach y Wolk, 1973; Stewart y Codd, 1975), mientras que las células vegetativas no poseen la capacidad de fijación de nitrógeno

atmosférico. Por lo tanto, para el correcto mantenimiento del metabolismo del filamento en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico, existe un intercambio de compuestos reducidos de carbono desde las células vegetativas hacia los heterocistos, y de compuestos nitrogenados desde éstos hacia las células vegetativas (Figura 1.4C) (Muro-Pastor y Hess, 2012; Herrero *et al.*, 2016). En los heterocistos, los carbohidratos obtenidos de las células vegetativas se degradan principalmente mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, obteniendo de este modo energía y poder reductor (Magnuson y Cardona, 2016).

La diferenciación de una célula vegetativa como heterocisto implica profundos cambios morfológicos derivados de la formación de una gruesa envuelta multicapa que se deposita sobre la pared celular Gram-negativa (Flores y Herrero, 2010; Flores *et al.*, 2018). Esta envuelta adicional, compuesta de una capa interna de glicolípidos específicos del heterocisto (Bryce *et al.*, 1972), y de una capa externa más gruesa de polisacáridos (Cardemil y Wolk, 1979), limita la entrada de gases en el heterocisto (Murry y Wolk, 1989). La deposición de esta envuelta también tiene como consecuencia el estrechamiento de la unión entre el heterocisto y las células adyacentes reduciéndose la superficie de contacto y por lo tanto el intercambio gaseoso entre ambos tipos celulares (Fay, 1992). Otra adaptación estructural importante del heterocisto es la reorganización de las membranas intracitoplasmáticas. Mientras que en las células vegetativas las membranas tilacoidales presentan una organización concéntrica y periférica, en los heterocistos se reorganizan disponiéndose mayoritariamente en zonas próximas a los polos (Wildon y Mercer, 1963; Lang y Fay, 1971; Fay, 1992), formando una estructura denominada *honeycomb* (Lang y Fay, 1971). En estas membranas tiene lugar una intensa actividad respiratoria, lo que reduce el nivel de oxígeno evitando su efecto inhibitorio sobre la nitrogenasa (Valladares *et al.*, 2007), al tiempo que se proporciona ATP para la reducción de N_2 . Además, en los heterocistos maduros no hay síntesis *de novo* de ficobiliproteínas (Yamanaka y Glazer, 1983), motivo por el que los heterocistos poseen una cantidad significativamente reducida de pigmentos fotosintéticos con respecto a las células vegetativas. En cualquier caso, las ficobiliproteínas de los heterocistos permanecen activas, constituyendo el complejo antena que transporta energía al fotosistema I (Cardona y Magnuson, 2010; Magnuson y Cardona, 2016). La estructura de los ficobilisomas en los heterocistos también difiere de la observada en las células vegetativas. Los ficobilisomas de las células vegetativas suelen estar anclados al fotosistema II, y normalmente están formados por un núcleo central compuesto por trímeros de aloficocianina, al que se unen de seis a ocho cilindros periféricos compuestos de ficocianina y, en ocasiones, de ficoeritrina. Por su parte, los ficobilisomas de los heterocistos parecen interactuar con el fotosistema I, y son de menor tamaño en general, formados por un núcleo de aloficocianina más pequeño, y cilindros de ficocianina y ficoeritrina más cortos (Magnuson y Cardona, 2016).

1.2. RNAs reguladores en bacterias

El dogma central de la biología postulaba que el flujo de la información en un sistema biológico es unidireccional y culmina con la síntesis de proteínas (Crick, 1970), con el RNA actuando como intermediario en la cadena de traducción del mensaje genético. Sin embargo, los estudios basados en el uso de metodologías avanzadas de análisis masivo han revelado que los transcriptomas primarios, tanto de organismos eucariotas como de bacterias, incluyen, además de RNAs funcionales como los RNAs ribosómicos o transferentes, una cantidad inesperadamente elevada de transcritos no codificantes (RNAs no codificantes), que están implicados en una gran variedad de procesos (Wade y Grainger, 2014), y específicamente en aspectos de regulación de la expresión génica. Así, los mecanismos que controlan la expresión génica no pueden ser entendidos actualmente sin la participación de los RNAs reguladores, que se han revelado como ubicuos en todos los organismos vivos. En bacterias, los RNAs reguladores controlan la expresión de genes implicados en multitud de procesos a través de distintos mecanismos de acción, que en la mayoría de los casos implican la interacción mediante complementariedad con otros mRNAs cuya estabilidad y/o traducción se ve afectada por dicha interacción (Wagner y Romby, 2015).

Hay dos grandes grupos de RNAs reguladores, aquellos que se transcriben en disposición antisentido de las moléculas que regulan (*antisense RNAs*, asRNAs), y los pequeños RNAs reguladores (*small RNAs*, sRNAs), que se transcriben en regiones genómicas distintas a los genes que regulan. En general, los sRNAs presentan un tamaño de entre 50 y 300 nucleótidos (nt), y en muchos casos cuentan con un promotor propio y con un terminador independiente de Rho (Storz et al., 2011).

Los RNAs reguladores pueden transcribirse a partir de DNA como tales, derivar del procesamiento de una molécula de RNA por parte de alguna ribonucleasa, o incluso formar parte del propio mRNA que regulan, como en el caso de los ribointerruptores (Tucker y Breaker, 2005; Garst et al., 2011). De este modo, hay moléculas que se transcriben en la cadena complementaria al gen que regulan, como es el caso de los asRNAs (Figura 1.5A-C), moléculas de sRNA que se transcriben desde genes independientes (Figura 1.5D), otras que derivan del procesamiento de RNAs de mayor tamaño (Figura 1.5E), como SdsN (Hao et al., 2016), moléculas de sRNA que se transcriben desde regiones del mRNA no traducidas 3'UTR (UTR, *Untranslated región*), como por ejemplo DapZ (Chao et al., 2012), desde promotores internos en regiones codificantes, como MicL (Guo et al., 2014), o desde el mismo promotor de un gen (Figura 1.5F) (Wagner y Romby, 2015).

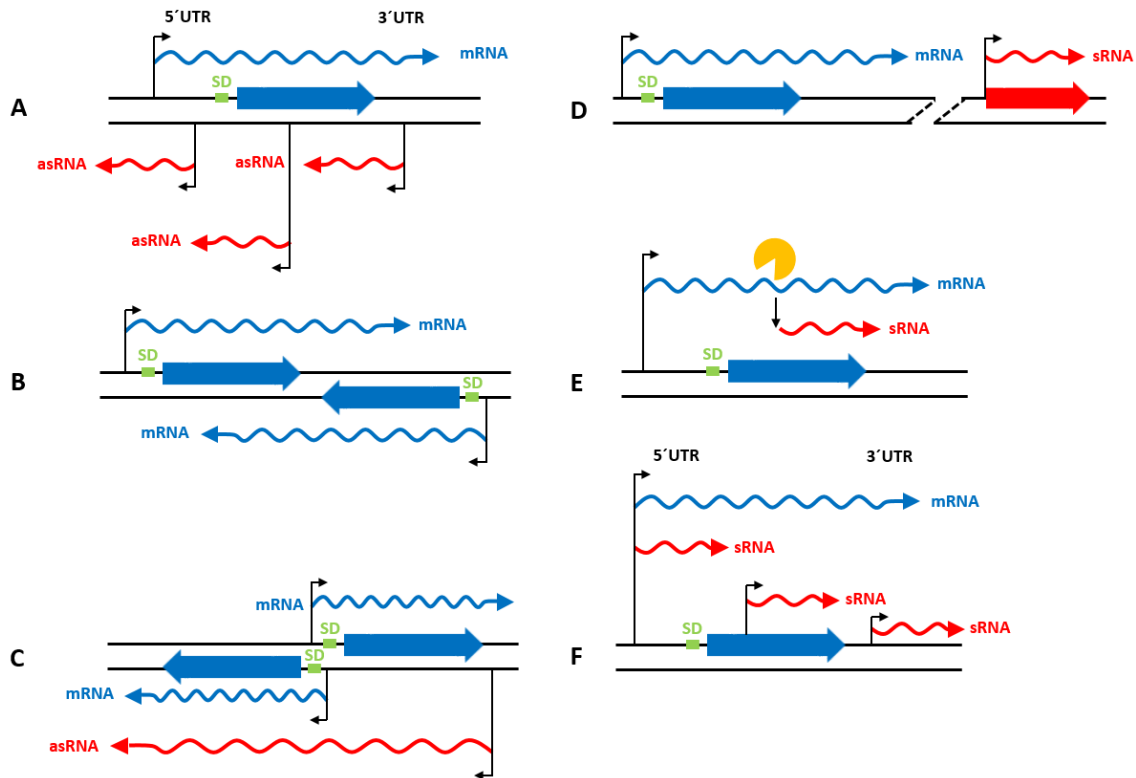


Figura 1.5. Biogénesis de los RNAs reguladores. Representación esquemática de diferentes procesos de transcripción que generan moléculas de asRNAs o sRNAs. **(A-C)** Los asRNAs pueden ser complementarios a la región codificante del gen diana, o a sus regiones 5'UTR y 3'UTR **(A)**. También es posible que el mRNA de un gen solape con el mRNA de otro gen transcrito en la hebra contraria **(B-C)**. **(D-F)** Los sRNAs pueden sintetizarse como genes independientes **(D)**, por el procesamiento de un mRNA **(E)**, desde regiones codificantes a partir de promotores internos, o desde las regiones 5'UTR y 3'UTR **(F)**. Las líneas negras paralelas representan las cadenas de DNA y las flechas verticales los TSS. Se muestra en verde la región Shine-Dalgarno y en naranja la RNasa.

Es muy común que los RNAs reguladores actúen a nivel postranscripcional, complementando la regulación ejercida por los reguladores transcripcionales, y ajustando las respuestas a diferentes situaciones ambientales (Wagner y Romby, 2015). La combinación de la acción de factores de transcripción y RNAs reguladores proporciona un nivel adicional de regulación que en muchos casos resulta en circuitos complejos, coherentes o incoherentes, que implican el factor de transcripción, el RNA regulador en cuestión, y el mRNA diana regulado (Figura 1.6) (Mandin y Guillier, 2013; Nitzan *et al.*, 2017). Hay estudios que sugieren que los mecanismos de regulación postranscripcional podrían contribuir tanto o más que la propia regulación transcripcional a la hora de determinar la concentración final de algunas proteínas (Vogel y Marcotte, 2012).

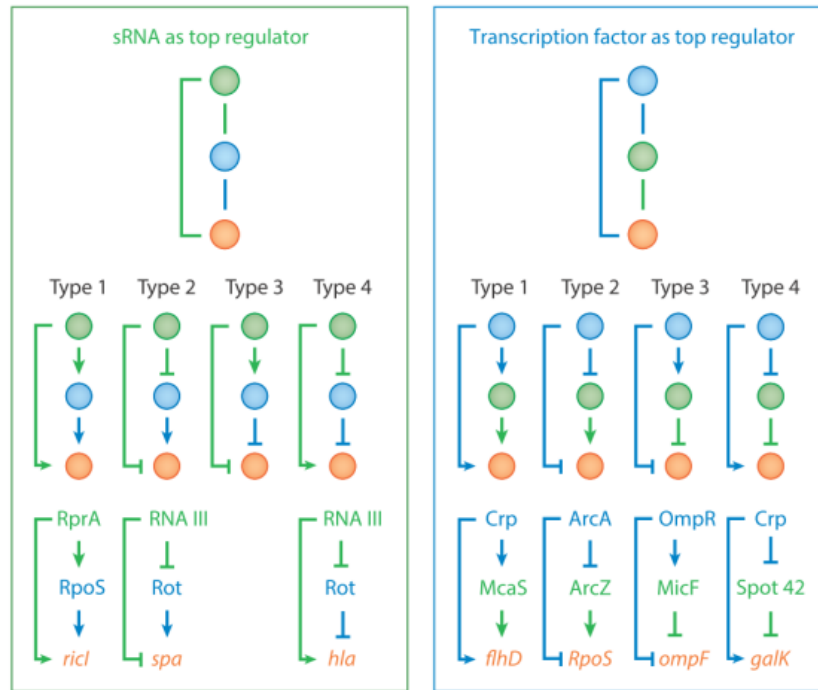


Figura 1.6. Circuitos reguladores mixtos que involucran un sRNA y un factor de transcripción. Los circuitos reguladores mixtos pueden tener como regulador principal un sRNA (panel izquierdo) o un factor de transcripción (panel derecho). Los sRNAs se representan con un círculo verde, los factores de transcripción con un círculo azul, y los mRNAs diana con un círculo rojo. Las flechas indican una regulación positiva, y las líneas truncadas una regulación negativa. Se muestran todas las configuraciones posibles, acompañadas de un ejemplo biológico cuando esté disponible. La numeración de los diferentes tipos de circuitos reguladores está basada en (Mangan *et al.*, 2003). Los ejemplos del panel izquierdo corresponden a *Salmonella* (tipo 1) y *Staphylococcus aureus* (tipos 2 y 4). Todos los ejemplos del panel derecho corresponden a *Escherichia coli* (*E. coli*). Imagen tomada de (Nitzan *et al.*, 2017).

La regulación mediada por RNAs podría tener varias ventajas sobre los mecanismos de regulación basados en proteínas. La síntesis de este tipo de moléculas de RNA es más rápida y menos costosa para la célula ya que son más cortas que la mayoría de los mRNAs (50-300 nucleótidos comparados con los 1.000 nucleótidos de un mRNA promedio en *E. coli*), y no requieren el proceso adicional de la traducción. Además, el propio efecto de los RNAs reguladores también puede ser más rápido que el ejercido por una proteína reguladora (Waters y Storz, 2009). Por ejemplo, en el caso de los ribointerruptores, que como ya se ha mencionado forman parte del propio mRNA que regulan, el acoplamiento de un ligando directamente al mRNA permite que la célula responda a la señal de una manera extremadamente rápida y sensible. De hecho, estas expectativas están respaldadas por algunas simulaciones dinámicas (Shimoni *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2008).

1.2.1. Tipos de RNAs reguladores

Los RNAs reguladores que ejercen su función mediante interacción con mRNAs diana pueden clasificarse en *cis* o *trans* según la posición desde la que se transcriben con respecto a la diana a la que regulan.

1.2.1.1. RNAs reguladores codificados en *cis*

Se denominan RNAs reguladores codificados en *cis* aquellos que se transcriben en regiones genómicas adyacentes a los genes que regulan, pudiendo solapar con la secuencia de los mRNAs codificados por dichos genes. El grupo de RNAs reguladores codificados en *cis* más numeroso está conformado por los asRNAs, que se transcriben desde la cadena de DNA complementaria al gen que regulan, presentando con el mRNA una complementariedad de bases perfecta que puede llegar a ser bastante extensa. Como ya se ha mencionado, la complementariedad de bases entre el asRNA y su mRNA diana puede ocurrir tanto en la región codificante como en las regiones 5'UTR y 3'UTR del mRNA (Figura 1.5A). Además, el mRNA de un gen puede solapar total o parcialmente con el mRNA de otro gen transcrito en la hebra contraria (Figura 1.5B-C) (Georg y Hess, 2011; Lasa *et al.*, 2011; Lasa *et al.*, 2012; Lybecker *et al.*, 2014). Dado que la transcripción de asRNAs y sus dianas tiene lugar en dirección opuesta, los asRNAs pueden regular la expresión de sus mRNAs diana interfiriendo en el proceso de la transcripción, o bien a nivel postranscripcional, promoviendo la degradación del mRNA, o inhibiendo su traducción (Figura 1.7) (Thomason y Storz, 2010; Georg y Hess, 2011; 2018).

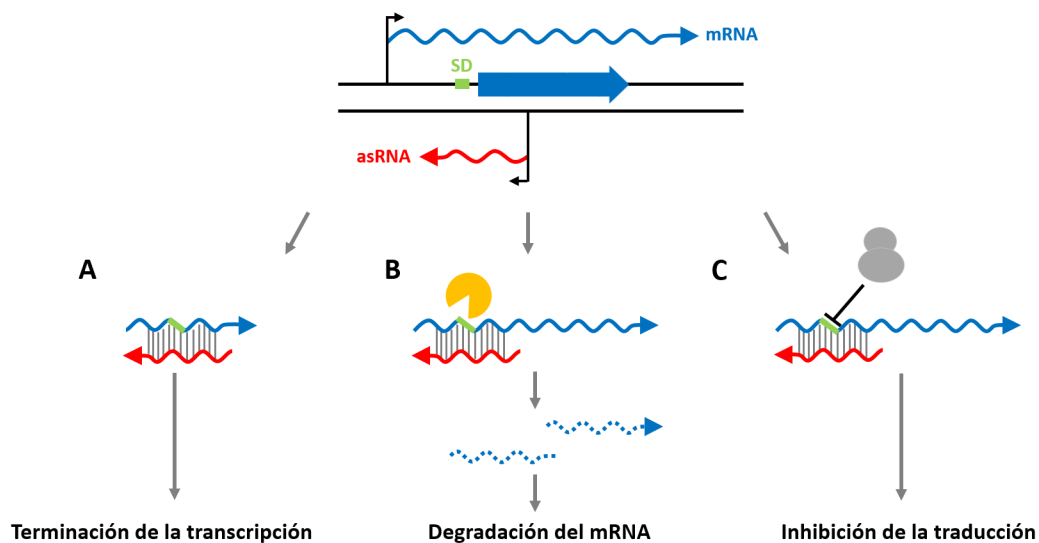


Figura 1.7. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los asRNAs. El apareamiento de bases entre el asRNA (rojo) y el mRNA diana (azul) puede causar la terminación de la transcripción (A), dirigir una RNasa (naranja) al dúplex asRNA-mRNA y causar la degradación del mRNA (B), o impedir la unión del ribosoma (gris) a la región Shine-Dalgarno (verde) inhibiendo la traducción (C). Imagen adaptada de (Waters y Storz, 2009).

Los asRNAs se identificaron inicialmente en plásmidos, elementos transponibles y bacteriófagos, donde forman parte de los sistemas de control del número de copias (Brantl, 2007). Mientras que los asRNAs codificados en plásmidos se expresan constitutivamente, y están implicados en la regulación de la replicación, conjugación o segregación, los asRNAs cromosómicos suelen transcribirse sólo bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, GadY se expresa en la fase estacionaria (Opdyke *et al.*, 2004), e IsrR sólo en presencia de hierro (Dühning *et al.*, 2006).

Introducción

Dentro del grupo de RNAs reguladores codificados en *cis* también se encuentran los ribointerruptores, que como ya se ha mencionado, forman parte de la región 5'UTR de los mRNAs que regulan (Garst *et al.*, 2011). La estructura básica de los ribointerruptores consiste fundamentalmente en dos dominios: un aptámero o dominio sensor, que es reconocido por un ligando concreto, y una plataforma de expresión o dominio efector, que cambia su estructura en respuesta a dicha unión (Breaker, 2012; Serganov y Nudler, 2013). Estas modificaciones estructurales están relacionadas con variaciones en las concentraciones de los metabolitos que son detectados por estos elementos (Serganov, 2009). De este modo, la unión del ligando correspondiente al dominio sensor provoca un cambio en la estructura secundaria del dominio efector, haciendo que la transcripción o la traducción del mRNA diana se vean afectadas (Figura 1.8) (Garst *et al.*, 2011). En ocasiones, una parada prematura en la transcripción genera un sRNA. Se ha demostrado que los sRNAs derivados de los ribointerruptores también pueden actuar en *trans* regulando otros genes (Loh *et al.*, 2009).

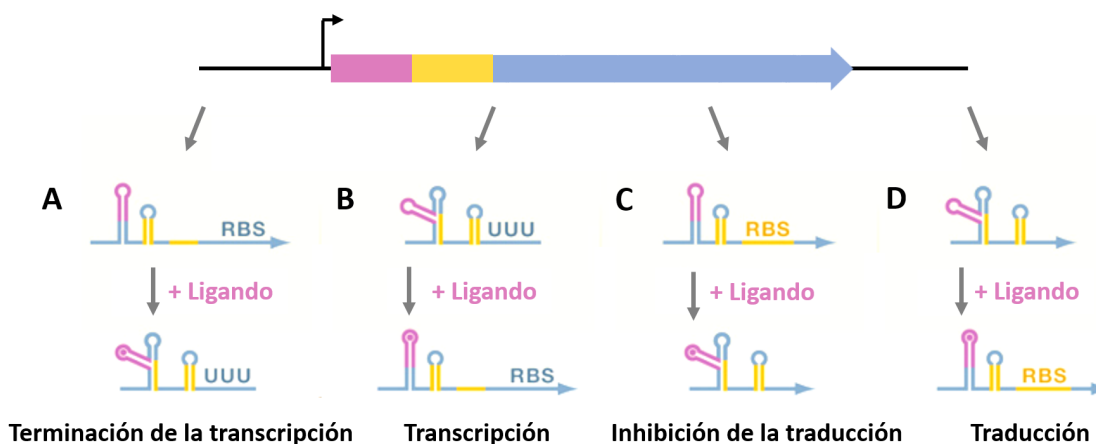


Figura 1.8. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los ribointerruptores. Los ribointerruptores se componen de un aptámero (rosa) y de una plataforma de expresión (naranja) en la región 5'UTR del mRNA que regulan (azul). La unión del ligando al dominio sensor puede afectar a la transcripción o traducción del mRNA. **(A)** En ausencia de ligando, la plataforma de expresión asume una conformación que permite la transcripción del mRNA. Cuando el ligando se une a la región del aptámero se produce un cambio conformacional en la plataforma de expresión, que conduce a la formación de una horquilla alternativa seguida por una cadena de residuos de Us. Esta horquilla alternativa actúa como un terminador transcripcional, inhibiendo la expresión del gen. **(B)** En ausencia de ligando, el ribointerruptor inicialmente forma un terminador. Tras la unión del ligando, este terminador se interrumpe, lo que permite que la transcripción continúe. **(C)** En ausencia de ligando, el sitio de unión al ribosoma (RBS, "Ribosome Binding Site") es accesible, pero, al unirse el ligando, es secuestrado generando una horquilla, lo que impide la traducción. **(D)** En ausencia de ligando, la plataforma de expresión forma una estructura secundaria que ocluye el sitio de unión al ribosoma. Cuando el ligando se une a la región del aptámero, se libera el sitio de unión al ribosoma y se inicia la traducción. Imagen adaptada de (Waters y Storz, 2009).

1.2.1.2. RNAs reguladores codificados en *trans*

Se denominan RNAs reguladores codificados en *trans* aquellos que se transcriben en regiones genómicas distintas a los genes que regulan. En la mayoría de los casos se trata de sRNAs cuyo mecanismo de acción más común está basado en la interacción por complementariedad con su mRNA diana. Al transcribirse las dos especies de RNA desde

secuencias genómicas diferentes, las interacciones entre ambas moléculas de RNA suelen implicar regiones cortas de complementariedad discontinua (Bobrovskyy y Vanderpool, 2013), con una región de unión de 10 a 25 nucleótidos (Peer y Margalit, 2011). Como ya se ha mencionado, a pesar de que muchos RNAs reguladores codificados en *trans* se transcriben de forma aislada desde regiones intergénicas (Figura 1.5D), algunos derivan del procesamiento de RNAs de mayor tamaño (Figura 1.5E), y otros se generan desde las regiones 5'UTR o 3'UTR, o desde la región codificante de un mRNA (Figura 1.5F) (Miyakoshi *et al.*, 2015; Wagner y Romby, 2015).

Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los RNAs reguladores codificados en *cis*, una característica común de los RNAs reguladores codificados en *trans* es que suelen regular múltiples mRNAs, incluso con efectos diferentes sobre la traducción o estabilidad de cada uno de ellos. Por otro lado, un mismo mRNA puede ser regulado por diversos sRNAs en respuesta a distintas señales. Esta peculiaridad, que contribuye a su versatilidad funcional, es consecuencia directa de la hibridación imperfecta entre los sRNAs y los mRNAs a los que regulan. Por lo tanto, podría decirse que este tipo de RNAs reguladores pueden modular globalmente una respuesta fisiológica particular, de una manera muy similar a un factor de transcripción, pero a nivel postranscripcional (Gottesman y Storz, 2011).

Los efectos de la interacción entre los sRNAs y sus mRNAs diana pueden tener consecuencias tanto positivas como negativas sobre la expresión génica. En muchos casos, la interacción entre el sRNA y el mRNA tiene lugar en la región 5'UTR del mRNA, cerca de o en el sitio de unión al ribosoma, afectando a la traducción del mensajero (Figura 1.9A) (Wagner y Romby, 2015). Además, el bloqueo de la traducción suele ir acompañado de un efecto negativo sobre la estabilidad del mRNA, dado que la unión del sRNA puede promover la degradación del mRNA a través del reclutamiento de RNasas, como la RNasa E o la RNasa III (Figura 1.9B) (Waters y Storz, 2009). Sin embargo, en ocasiones la región 5'UTR de los mRNAs está estructurada de tal forma que el sitio de unión al ribosoma no está accesible. En estos casos, la unión del sRNA podría generar un cambio en la estructura secundaria del mRNA, provocando que la secuencia de unión al ribosoma quede accesible, y permitiendo el inicio de la traducción (Figura 1.9C) (Fröhlich y Vogel, 2009). Aparte de la interacción con regiones 5'UTR de transcritos monocistrónicos o del primer gen de un operón, los sRNAs también pueden reconocer secuencias complementarias en mensajeros policistrónicos para inhibir o activar selectivamente la síntesis de algunas proteínas codificadas por el operón. Es el caso por ejemplo del RNA denominado Spot42, determinante en la descoordinación de la expresión de los genes del operón *galETKM* de utilización de galactosa en *E. coli* (Møller *et al.*, 2002). Asimismo, se han descrito casos en los que la interacción ocurre en la zona codificante o en la región 3'UTR del mRNA (Jagodnik *et al.*, 2017).

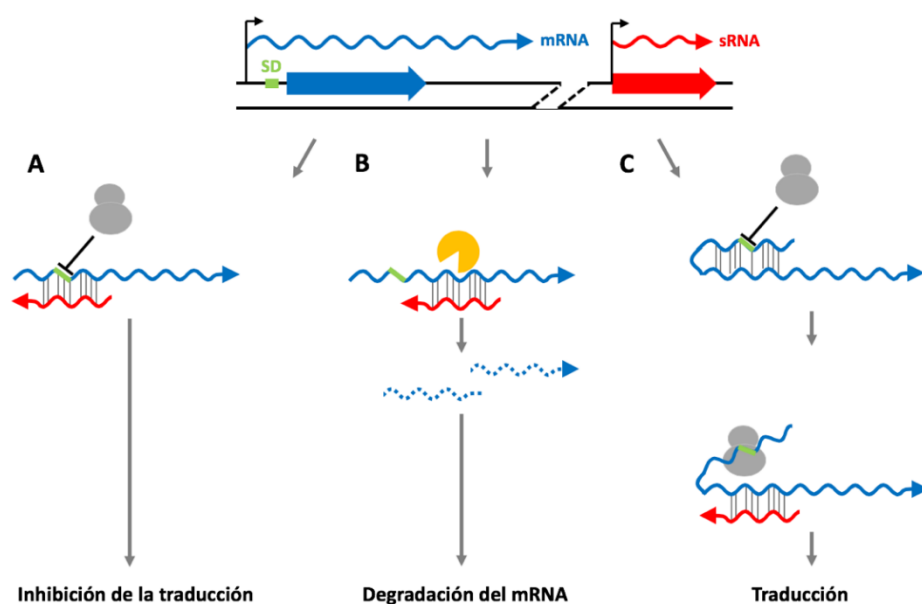


Figura 1.9. Representación esquemática de algunos mecanismos de acción de los sRNAs codificados en *trans*. Los sRNAs codificados en *trans* (rojo) se transcriben en una región genómica distinta a los mRNAs que regulan (azul), y sólo presentan una complementariedad de bases limitada con los mismos. **(A)** La unión del sRNA a la región 5'UTR del mRNA bloquea el sitio de unión al ribosoma, impidiendo que la traducción tenga lugar. El ribosoma se representa en gris, y la región Shine-Dalgarno (SD) en verde. **(B)** La interacción de los dos RNAs puede dirigir una RNasa (naranja) al dúplex sRNA-mRNA y causar la degradación del mRNA. **(C)** El sRNA también puede tener un efecto positivo en la traducción del mRNA. En estos casos la interacción genera un cambio en la estructura secundaria del mRNA, provocando que el sitio de unión al ribosoma quede accesible, y permitiendo el inicio de la traducción. Imagen adaptada de (Waters y Storz, 2009).

Además de estos mecanismos de acción, se han descrito sRNAs que pueden actuar uniéndose a proteínas reguladoras, evitando que éstas lleven a cabo su función. En este caso, el sRNA contiene secuencias que mimetizan el sitio de unión de la proteína reguladora a una molécula de RNA, de forma que es capaz de secuestrar al regulador, y evitar que éste se una a la secuencia de RNA donde ejercería su función. Un ejemplo de este mecanismo de acción son los sRNAs CrcZ y CrcY en *Pseudomonas putida*, que secuestran al regulador Crc. La proteína Crc es un represor traduccional que reconoce una secuencia específica en algunos mRNAs y evita su traducción. En condiciones de represión catabólica los niveles de CrcZ y CrcY son muy bajos, por lo que queda disponible suficiente Crc para bloquear la traducción de los genes implicados en el catabolismo de las fuentes de carbono no preferenciales. Por el contrario, en ausencia de represión catabólica los niveles de CrcZ y CrcY aumentan y secuestran a Crc, permitiendo de este modo la expresión de los genes implicados en el consumo de fuentes de carbono no preferenciales (Moreno *et al.*, 2012).

En algunas bacterias como *E. coli*, la función de muchos RNAs reguladores codificados en *trans* depende de la proteína de unión a RNA Hfq, que facilita y estabiliza la interacción discontinua entre los sRNAs y sus dianas (Waters y Storz, 2009; Updegrove *et al.*, 2016), mientras que los sRNAs codificados en *cis* no requieren, generalmente, la intervención de Hfq para interactuar con su diana (Brantl, 2007). No todas las bacterias codifican la proteína Hfq (Sun

et al., 2002), aunque recientemente se han identificado otras proteínas con funciones análogas a Hfq con un papel global en la interacción con sRNAs (Pandey *et al.*, 2011; Attaiech *et al.*, 2017; Holmqvist y Vogel, 2018). Estudios recientes han mostrado que las proteínas que contienen un dominio ProQ/FinO constituyen una nueva clase de chaperonas de RNA que podrían desempeñar un papel clave en la regulación génica postranscripcional en la mayoría de las especies bacterianas (Attaiech *et al.*, 2017; Olejniczak y Storz, 2017). Un ejemplo muy bien descrito de este grupo de proteínas es ProQ, una proteína de unión a RNA de tipo FinO, que fue identificada mediante Grad-Seq (*gradient profiling by sequencing*) en *Salmonella enterica* (Smirnov *et al.*, 2016). Esta proteína conservada de unión a RNA reconoce sus dianas a través de motivos estructurales encontrados en sRNAs y en el extremo 3' de los mRNAs (Holmqvist *et al.*, 2018).

En *Nostoc* sp. PCC 7120 se ha demostrado que la ausencia de Hfq afecta a la asimilación de nitrato (Puerta-Fernández y Vioque, 2011), si bien el mecanismo de esta regulación, como la capacidad de Hfq para regular la expresión de genes mediante la interacción con sRNAs es desconocida. Además, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha demostrado que la ausencia de Hfq afecta a la motilidad (Dienst *et al.*, 2008). Un análisis de las estructuras cristalinas de las proteínas Hfq de *Nostoc* sp. PCC 7120 y *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveló que las Hfq cianobacterianas son bastante similares en estructura a otras proteínas Hfq bacterianas conocidas, a pesar de que carecen de varios elementos de secuencia clave. Las Hfq cianobacterianas poseen una variante de sitios de unión a RNA, presentando *in vitro* una afinidad significativamente menor por los sRNAs de *E. coli* conocidos, y no siendo capaces de mediar *in vivo* la regulación dependiente de Hfq en *E. coli* (Bøggild *et al.*, 2009).

En cuanto a la interacción de los RNAs reguladores codificados en *trans* con sus mRNAs diana, se han descrito elementos en la estructura y la secuencia de los sRNAs que afectan a la interacción con sus dianas. La gran mayoría de este tipo de sRNAs contiene una región 3'UTR estructurada seguida de una secuencia de múltiples uracilos (poli U), lo cual promueve una terminación de la transcripción independiente de Rho, y protege al sRNA frente a 3'-exonucleasas. En los sRNAs que interaccionan con Hfq, el dominio de unión a la misma suele coincidir con regiones ricas en As/Us próximas a esta estructura terminadora. Además, aunque las interacciones entre sRNAs y mRNAs diana implican complementariedad en regiones cortas y discontinuas, siempre suele haber un segmento de 6-7 pares de bases (pb) consecutivos que se denomina *seed* (Storz *et al.*, 2011). Cabe destacar que la hibridación en la región *seed* contribuye a que se mantenga la especificidad regulatoria, ya que un solo cambio en dicha secuencia podría afectar a la unión con el mRNA (Papenfort *et al.*, 2012). Curiosamente, la región *seed* de muchos sRNAs se localiza cerca de su extremo 5' (Guillier y Gottesman, 2008; Papenfort *et al.*, 2010), lo cual sugiere que esta zona 5' podría ser relevante para la función de los sRNAs.

1.2.2. Métodos de identificación de RNAs reguladores y sus dianas

Hasta la década de los noventa los pocos RNAs reguladores conocidos se habían encontrado de forma fortuita debido a su abundancia o a la aparición de fenotipos asociados a la sobreexpresión de los mismos. En los primeros años de este siglo, las búsquedas globales computacionales basadas en la predicción de señales de transcripción o en patrones de conservación de secuencias en regiones intergénicas, permitieron la identificación de posibles sRNAs reguladores en *E. coli* (Argaman *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2001). Sin embargo, las herramientas bioinformáticas disponibles en aquel entonces presentaban una alta tasa de falsos positivos (Richter y Backofen, 2012). Posteriormente han ido surgiendo nuevas alternativas para la identificación de RNAs reguladores, como las búsquedas computacionales sistemáticas, o la detección directa utilizando técnicas basadas en clonación o en *microarrays* con sondas en regiones intergénicas (Altuvia, 2007; Livny y Waldor, 2007), que permitieron el descubrimiento de nuevos RNAs reguladores. La creciente disponibilidad de secuencias de genomas bacterianos, así como la aplicación de nuevas tecnologías al análisis del transcriptoma, fundamentalmente RNA-Seq, han permitido recientemente la predicción e identificación de cientos de posibles RNAs reguladores en bacterias (Sorek y Cossart, 2010; Sharma y Vogel, 2014), así como de sus mRNAs diana.

De entre todos los métodos para la predicción e identificación de RNAs reguladores, una variante del RNA-Seq, denominada RNA-Seq diferencial (dRNA-Seq) (Sharma y Vogel, 2014), que permite la identificación precisa de todos los sitios de inicio de la transcripción (TSS), ha demostrado ser un enfoque muy exitoso. La metodología dRNA-Seq incluye el tratamiento de las muestras de RNA con la exonucleasa TEX (*Terminator 5'-Phosphate-dependent Exonuclease*), que es específica de extremos 5'-monofosfato eliminando aquellos RNAs que no son transcritos primarios. De este modo, las lecturas de secuenciación obtenidas corresponden sólo a transcritos con extremos 5'-trifosfato, es decir, extremos primarios no procesados. Así, y a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos convencionales de RNA-Seq, el resultado proporciona información precisa sobre los TSS, y en consecuencia sobre las secuencias promotoras de cada transcrito, incluyendo todos los transcritos que no están asociados a zonas codificantes. Este acercamiento es además muy valioso para el análisis de transcriptomas complejos, como el de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b), un organismo en el que coexisten en los filamentos dos tipos celulares (células vegetativas y heterocistos).

Como se ha mencionado, las interacciones de los RNAs reguladores codificados en *trans* con sus dianas tienen lugar en segmentos cortos y discontinuos, lo que dificulta la identificación de los posibles mRNAs diana mediante medios predictivos (Bobrovskyy y Vanderpool, 2013).

Así pues, la identificación de dianas debe abordarse mediante una combinación de metodologías. Uno de los acercamientos más avanzados está basado en predicciones computacionales realizadas con el algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014), que analiza las posibles interacciones de un sRNA con todo el transcriptoma de un organismo. Este algoritmo implementa información relativa a la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas en organismos relacionados, y combina las predicciones con homólogos de otros organismos. Además, CopraRNA tiene en cuenta el plegamiento de ambas moléculas y la energía de hibridación en la predicción de la zona de interacción. Alternativamente, se puede realizar un análisis transcriptómico de estirpes con niveles alterados del sRNA en cuestión, ya sea por mutación o sobreexpresión. La comparación de los niveles de mRNAs en una estirpe silvestre y en una estirpe que carece del sRNA o que lo sobreexpresa, puede sugerir que algunos de los cambios observados sean atribuibles a una posible interacción entre el sRNA y los correspondientes mRNAs. Cualquier predicción, en todo caso, debe ser verificada experimentalmente mediante metodologías adicionales. Por otro lado, recientemente se han desarrollado diversos métodos para la identificación directa *in vivo* de dianas. Entre estas técnicas se incluye MAPS (*MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing*), un protocolo basado en la purificación de sRNAs etiquetados con MS2 mediante cromatografía de afinidad por MS2, y que combinado con análisis de RNA-Seq ha permitido ensamblar los “targetomas” completos de algunos sRNAs bacterianos (Carrier *et al.*, 2016). Otro acercamiento para la identificación directa *in vivo* de dianas es GRIL-Seq (*Global sRNA Target Identification by Ligation and Sequencing*), una metodología basada en la ligación preferencial de los sRNAs con los extremos de sus mRNAs diana en bacterias que coexpresan la RNA ligasa del bacteriófago T4, seguida posteriormente de secuenciación para identificar las quimeras formadas por la ligación del sRNA al mRNA diana (Han *et al.*, 2016).

1.2.3. RNAs reguladores en cianobacterias

1.2.3.1. Identificación de RNAs reguladores en cianobacterias

Los acercamientos globales para la identificación de secuencias que pudieran codificar RNAs reguladores en los genomas de cianobacterias se han llevado a cabo mediante procedimientos que incluyen la predicción computacional seguida de validación experimental (Axmann *et al.*, 2005; Voß *et al.*, 2009; Ionescu *et al.*, 2010; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), el análisis de *microarrays* (Steglich *et al.*, 2008; Georg *et al.*, 2009; Gierga *et al.*, 2012) o la secuenciación global de transcriptomas (RNA-Seq) (Mitschke *et al.*, 2011a; Mitschke *et al.*, 2011b; Voß *et al.*, 2013; Pfreundt *et al.*, 2014).

Introducción

Al igual que en otros grupos de bacterias, en los transcriptomas de cianobacterias analizados hasta ahora, entre las que se incluyen las cianobacterias modelo unicelulares *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Kopf *et al.*, 2014a; Kopf *et al.*, 2014c), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Mitschke *et al.*, 2011a; Billis *et al.*, 2014; Kopf *et al.*, 2014b), *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 (Vijayan *et al.*, 2011; Billis *et al.*, 2014), o la cianobacteria formadora de heterocistos *Nostoc* sp. PCC 7120 (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b), así como especies particularmente relevantes en entornos naturales, como *Trichodesmium erythraeum* (Pfreundt *et al.*, 2014), *Nodularia spumigena* CCY9414 (Voß *et al.*, 2013; Kopf *et al.*, 2015), *Synechococcus* marino (Gierga *et al.*, 2012) o *Prochlorococcus* (Steglich *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2011; Waldbauer *et al.*, 2012; Voigt *et al.*, 2014), la transcripción no codificante representa más del 10% de los promotores activos.

En nuestro laboratorio se había llevado a cabo un análisis transcriptómico en *Nostoc* sp. PCC 7120, realizado mediante dRNA-Seq, proporcionando información relativa a todos los TSS del genoma, así como de su dinámica de uso en respuesta a la deficiencia de nitrógeno combinado (Mitschke *et al.*, 2011b). Debido a que la adaptación a la deficiencia de nitrógeno incluye en este organismo la diferenciación de heterocistos, se comparó el transcriptoma tras 8 horas en ausencia de nitrógeno combinado con el transcriptoma en presencia de amonio, tanto en la estirpe silvestre *Nostoc* sp. PCC 7120 como en un mutante *hetR*, incapaz de diferenciar heterocistos. De este modo, se definieron dos categorías principales de transcritos cuya expresión responde a la disponibilidad de nitrógeno, aquellos que dependen exclusivamente de NtcA, el regulador global de la asimilación de nitrógeno, y aquellos que dependen adicionalmente de HetR, el regulador específico de la diferenciación de heterocistos (Mitschke *et al.*, 2011b). A partir de estos datos de dRNA-Seq se pueden identificar posiciones intergénicas cuya transcripción exhibe una clara regulación en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado. La conservación filogenética de las secuencias que se transcribirían desde estas posiciones, así como la conservación de sus secuencias promotoras, sugiere en algunos casos que podría tratarse de RNAs reguladores funcionales. La regulación de la transcripción de estos posibles RNAs reguladores en función de la disponibilidad de nitrógeno sugiere que algunos de ellos podrían estar implicados en la regulación de la respuesta general de adaptación a la deficiencia de nitrógeno o específicamente en la diferenciación de heterocistos.

También en nuestro laboratorio se ha diseñado una estrategia computacional que permite la identificación global de secuencias que pudieran transcribirse como sRNAs conservados filogenéticamente en cianobacterias (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). Este estudio combina la información transcriptómica previa disponible en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b), con una predicción de terminadores independientes de Rho, y un

análisis filogenético de 89 genomas cianobacterianos (27 de ellos correspondientes a estirpes formadoras de heterocistos). El análisis filogenético muestra que alguno de los sRNAs predichos por el algoritmo presenta una distribución universal en todos los genomas cianobacterianos, mientras que otros están conservados únicamente en los genomas de cianobacterias con capacidades concretas, como la diferenciación de heterocistos, por lo que estos sRNAs podrían estar asociados a la regulación de dichas funciones (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016).

1.2.3.2. Procesos regulados por RNAs en cianobacterias

A diferencia de los mecanismos de regulación empleados por RNAs reguladores bien descritos desde hace años en enterobacterias, como *E. coli* o *Salmonella* (Papenfort y Vogel, 2014; Kopf y Hess, 2015), se desconocen todavía la mayoría de las funciones asociadas a este tipo de moléculas en cianobacterias (Kopf y Hess, 2015). Uno de los primeros RNAs reguladores descritos en cianobacterias fue el asRNA identificado en *Nostoc* sp. PCC 7120 para el gen *furA* (*all1691*), que se transcribe entre *sigC* y *alr1690* desde la hebra complementaria (Hernández *et al.*, 2006). Este asRNA se origina por la transcripción de *alr1690*, que se extiende a secuencias complementarias a *furA*, y participa en su regulación postranscripcional contribuyendo a determinar los niveles celulares de la proteína FurA, una proteína autorregulada cuya expresión aumenta ligeramente en deficiencia de hierro (Hernández *et al.*, 2006). Entre otras funciones, en *Nostoc* sp. PCC 7120 se ha demostrado que FurA está involucrada en la regulación de la expresión de *isiA*, cuyo producto participa en la respuesta a la deficiencia de hierro (Leonhardt y Straus, 1994), y que también está regulado a nivel postranscripcional por un asRNA en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ver más adelante) (Dühning *et al.*, 2006).

Más recientemente, se han descrito en cianobacterias algunos ejemplos de regulación postranscripcional mediada por este tipo de moléculas en el contexto de procesos clave como la fotosíntesis (Wilde y Hihara, 2016), o la asimilación de nitrógeno, el aspecto del metabolismo en el que se centra esta Tesis Doctoral. En la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito un sRNA implicado en el control de la fotosíntesis, PsrR1 (*photosynthesis regulatory RNA 1*). La transcripción de este sRNA se induce en condiciones de alta intensidad de luz (Georg *et al.*, 2014). La interacción de este sRNA con los mRNAs de *psaL*, *psaJ*, *chlN* y *cpcA* tiene lugar en las regiones de unión al ribosoma. Se ha caracterizado específicamente el efecto de PsrR1 sobre el mRNA de *psaL*, que codifica la subunidad XI del fotosistema I. De este modo, en intensidades elevadas de luz se reduce la acumulación del mRNA de *psaL*, que es procesado por la RNasa E en presencia de

Introducción

PsrR1 (Georg *et al.*, 2014). En un estudio posterior se demostró que PsrR1 participa, a nivel postranscripcional, en un circuito de regulación de la respuesta a situaciones cambiantes de luz (Kadowaki *et al.*, 2016). En condiciones de baja intensidad lumínica, el regulador transcripcional RpaB activa de forma directa la expresión de los genes del fotosistema I y se une a la región promotora de PsrR1, provocando una disminución de la expresión de *psrR1*. No obstante, la activación de los genes del fotosistema I y la unión con PsrR1 no tiene lugar en condiciones de alta intensidad lumínica, por lo que se produce una acumulación de moléculas de PsrR1, cuya función es evitar la traducción de los transcritos de los genes del fotosistema I preexistentes. De este modo, RpaB y PsrR1 constituyen un circuito regulador coherente de tipo IV (Figura 1.6). Mediante esta doble represión a nivel transcripcional (mediada por RpaB) y postranscripcional (mediada por PsrR1), se garantiza una regulación rápida y estricta del contenido del fotosistema I bajo situaciones cambiantes de luz (véase Figura 4.1 en el apartado Discusión) (Kadowaki *et al.*, 2016). Además, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 también se ha descrito un sRNA ampliamente conservado en cianobacterias, cuya expresión está inversamente correlacionada con la intensidad lumínica. Este sRNA, inicialmente denominado Ncr0700, y actualmente renombrado como PmgR1 (*photomixotrophic growth RNA 1*), es necesario para el crecimiento fotomixotrófico y la regulación de la acumulación de glucógeno (de Porcellinis *et al.*, 2016).

En *Synechocystis* sp. PCC 6803 también se han descrito varios asRNAs implicados en la regulación de la fotosíntesis. Se ha caracterizado el asRNA IsrR (*iron stress-repressed RNA*), cuya transcripción se reprime en condiciones de deficiencia de hierro. Este asRNA se acumula en presencia de hierro en el medio, interaccionando con la región codificante del transcrito *isiAB*, y provocando una disminución de los niveles de transcrito *isiA*, que codifica la proteína IsiA (*iron stress-induced protein A*). Esta proteína participa en la respuesta a la deficiencia de hierro formando una estructura de anillo alrededor del fotosistema I (Dühring *et al.*, 2006). Otro asRNA que actúa negativamente en *Synechocystis* sp. PCC 6803 es As1-flv4, que previene la expresión prematura del operón *flv4-2* ante un cambio en el suministro de carbono inorgánico (Eisenhut *et al.*, 2012). Las proteínas codificadas por el operón *flv4-2* tienen una función fundamental en la fotoprotección del fotosistema II contra el estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2012). Por el contrario, dos asRNAs, PsbA2R y PsbA3R, parecen tener una función reguladora positiva, al proteger las secuencias 5'UTR de los genes *psbA2* y *psbA3* de la degradación prematura por la RNasa E (Sakurai *et al.*, 2012).

En cianobacterias también se han identificado varios sRNAs regulados por la disponibilidad de nitrógeno, como NsiR4 (*nitrogen stress induced RNA 4*) en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kopf *et al.*, 2014b), o NsiR1, NsiR2, NsiR3 y NsrR1 (*nitrogen stress repressed RNA 1*) en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Ionescu *et al.*, 2010; Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016; Álvarez-Escribano *et al.*, 2018). Se ha descrito que NsiR4 está directamente involucrado, a nivel postranscripcional, en la regulación de la asimilación primaria de nitrógeno a través de la glutamina sintetasa (Klähn *et al.*, 2015). Esta enzima está estrechamente regulada, y en cianobacterias su actividad se controla mediante la interacción con los factores inactivantes IF7 e IF17, codificados por los genes *gifA* y *gifB* respectivamente (García-Domínguez *et al.*, 1999). La transcripción de NsiR4 se induce fuertemente en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado, y está mediada por NtcA. Se ha demostrado que NsiR4 interacciona con la región 5'UTR del mRNA de *gifA*. La interacción con esta región del mRNA dificulta el acceso del ribosoma a la región de inicio de la traducción, provocando una reducción de la expresión de IF7, lo que, por extensión, afecta a la actividad de la glutamina sintetasa, cuya regulación transcripcional también depende directamente de NtcA. De este modo, NtcA y NsrR1 constituyen un circuito regulador coherente de tipo IV (Figura 1.6), que involucra a NtcA como el regulador principal, y a NsiR4, que constituye un nuevo elemento en el esquema de regulación de la actividad glutamina sintetasa (véase Figura 4.1 en el apartado Discusión), una enzima clave para el control de la asimilación de nitrógeno (Klähn *et al.*, 2015).

Además, recientemente se ha caracterizado un ribointerruptor de glutamina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que ha resultado ser otro elemento clave para la regulación de la actividad glutamina sintetasa (Klähn *et al.*, 2018). En dicho trabajo se ha demostrado que un aptámero de unión a glutamina en la región 5'UTR de *gifB* es crítico para la expresión de IF17. La unión de glutamina induce cambios estructurales en la plataforma de expresión de este ribointerruptor, que derivan en aumento en los niveles de IF17. Los análisis bioinformáticos han revelado que los ribointerruptores de glutamina se encuentran de forma exclusiva, aunque frecuente, en los genomas cianobacterianos, asociados principalmente con homólogos de *gifB*. Así, este mecanismo común en las cianobacterias establece un complejo circuito regulador de retroalimentación, que acopla la inactivación de la actividad glutamina sintetasa, mediada por IF17, a los niveles de glutamina intracelular. Estas observaciones, junto con el mecanismo de acción de NsiR4 descrito anteriormente, muestran que la regulación mediada por RNAs reguladores es un componente importante en el control de la asimilación de nitrógeno en cianobacterias (Klähn *et al.*, 2018).

Introducción

Por último, en *Nostoc* sp. PCC 7120 se ha descrito también NsiR1, un sRNA dependiente de HetR que se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado (Ionescu *et al.*, 2010). La transcripción de este sRNA es un marcador muy temprano de aquellas células que se están diferenciando en heterocistos (Muro-Pastor, 2014), lo que sugiere que podría estar implicado en la regulación de este proceso de diferenciación.

Al objeto de avanzar en el conocimiento de las posibles funciones de algunos de los sRNAs cuya transcripción se ha demostrado que está regulada por la disponibilidad de nitrógeno en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), este trabajo de Tesis Doctoral se centra en la caracterización de los sRNAs NsiR3 y NsrR1.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral es identificar mecanismos reguladores orquestados por sRNAs en el marco de la regulación de la asimilación de nitrógeno en *Nostoc* sp. PCC 7120.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las funciones del sRNA NsiR3, un sRNA inducible en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA.
- Caracterizar las funciones del sRNA NsrR1, un sRNA reprimible en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA.

Algunos de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral ya han sido publicados:

- **Álvarez-Escribano, I.,** Vioque, A., and Muro-Pastor, A.M. (2018). NsrR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of *nblA* in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Frontiers in Microbiology* 9:2267. doi: 10.3389/fmicb.2018.02267

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas

El material biológico de estudio utilizado en este trabajo ha sido la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Nostoc* sp. PCC 7120 (= *Anabaena* sp. PCC 7120). También se han empleado diversas estirpes derivadas de *Nostoc* sp. PCC 7120 que han sido generadas durante este trabajo, o que estaban disponibles en la colección del laboratorio (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Estirpes derivadas de *Nostoc* sp. PCC 7120.

Estirpe	Descripción	Resistencia	Referencia
CSE2	<i>ntcA::CS3</i>	Sm Sp	(Frías <i>et al.</i> , 1994)
216	<i>hetR</i> (S179N)	-	(Buikema y Haselkorn, 1991)
$\Delta nsiR3$	Estirpe que carece de <i>nsiR3</i> generada por doble recombinación tras la integración del plásmido pELV17 en la región de <i>nsiR3</i> .	-	E. Olmedo-Verd (nuestro laboratorio)
$\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$	Estirpe en la que, tras la integración del plásmido pIAE24 en un fondo $\Delta nsiR3$, <i>nsiR3</i> se expresa bajo el control del promotor inducible por cobre del gen de la plastocianina (P_{petE}).	Sm Sp	Este trabajo
$\Delta nsrR1$	Estirpe que carece de <i>nsrR1</i> generada por doble recombinación tras la integración del plásmido pSAM325 en la región de <i>nsrR1</i> .	-	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
$\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$	Estirpe en la que, tras la integración del plásmido pIAE17 en un fondo $\Delta nsrR1$, <i>nsrR1</i> se expresa bajo el control del promotor inducible por cobre del gen de la plastocianina (P_{petE}).	Sm Sp	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
<i>all1871::CK3</i>	Estirpe en la que la parte central del marco abierto de lectura del gen <i>all1871</i> ha sido delecionada y sustituida por la casete CK3, que confiere resistencia a neomicina, tras la integración del plásmido pSAM326.	Nm	Este trabajo
<i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i>	Estirpe en la que, tras la integración del plásmido pIAE65 en la región <i>nucA-nuiA</i> (<i>all7362-alr7361</i>) del plásmido alfa de la estirpe <i>all1871::CK3</i> , <i>all1871</i> se expresa bajo el control del promotor <i>trc</i> diseñado para <i>E. coli</i> (Amann <i>et al.</i> , 1988).	Sm Sp Nm	Este trabajo
<i>all1871::gfp</i>	Estirpe en la que, tras la integración del plásmido pELV75, se expresa una fusión traduccional de <i>all1871</i> con el gen <i>gfp-mut2</i> .	Sm Sp	Este trabajo

Las resistencias a los distintos antibióticos se indican como Sm (estreptomycin), Sp (espectinomycin) y Nm (neomicina).

2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en condiciones axénicas en medio BG11* (* véase recetario, página 83) (Rippka *et al.*, 1979). Este medio de cultivo se preparaba a partir de una disolución 100 veces concentrada que contiene todos los componentes excepto el K_2HPO_4 , que se añadía antes de autoclavar el medio a una concentración final de 0,2 mM, y la fuente de nitrógeno. Como fuentes de nitrógeno se utilizaban $NaNO_3$ a una concentración final de 17,6 mM, o NH_4Cl a una concentración final de 3 mM en medio sólido, 4 mM en medio líquido, o 6 mM cuando las células se cultivaban en medio líquido burbujeando con una mezcla de aire enriquecida en CO_2 al 1% (v/v). En los casos en los que se incluía NH_4Cl como fuente de nitrógeno, el medio se tamponaba con TES-NaOH (pH 7,5) a una concentración final del doble de la usada para el NH_4Cl . Las disoluciones de NH_4Cl y TES-NaOH se esterilizaban mediante filtración, y se añadían al medio después de que éste hubiera sido autoclavado.

Las células se cultivaban a 30°C bajo iluminación continua de intensidad $75 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en distintos formatos. Para cultivos líquidos que no requerían del aporte de CO_2 , se utilizaban matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad conteniendo 30 ml de cultivo con agitación orbital continua a 100 rpm. Los cultivos burbujeados con una mezcla estéril de aire enriquecida en CO_2 al 1% (v/v) se llevaban a cabo en cilindros de vidrio de 240 ml de capacidad conteniendo 180 ml de cultivo, o en frascos de Roux de 900 ml de capacidad conteniendo 800 ml de cultivo. En estas condiciones, el medio se suplementaba además con $NaHCO_3$ a una concentración final de 10 mM.

Para los cultivos en medio sólido se añadía al medio Bacto-agar (*Difco*) al 1% (p/v), esterilizado en autoclave separadamente de los nutrientes, y mezclado con los mismos antes de verter en cajas de Petri. Los cultivos en caja de Petri se incubaban a 30°C con iluminación superior continua de intensidad $30 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

En caso de ser necesaria la presencia de antibióticos en el medio, éstos se suplementaban a las siguientes concentraciones finales: estreptomicina (Sm) $2 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio líquido y $5 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio sólido; espectinomicina (Sp) $2 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio líquido y $5 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio sólido; neomicina (Nm) $5 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio líquido y $25 \mu g \cdot ml^{-1}$ en medio sólido. Todos los antibióticos se esterilizaban previamente por filtración.

Para cultivar las estirpes mutantes de *Nostoc* sp. PCC 7120 en las que se expresan distintos genes bajo el control del promotor de *petE*, un promotor inducible por cobre, se usaba una versión modificada del medio BG11*, denominada BG11- Cu^{2+} , que carece de sales de cobre. Este medio se preparaba con agua ultrapura a partir de un concentrado de sales sin cobre. Para inducir la transcripción desde el promotor de *petE*, se añadía $1,5 \mu M$ de $CuSO_4$ al medio.

2.1.1.3. Métodos de recogida y lavado de células

Las células de *Nostoc* sp. PCC 7120 o de las estirpes mutantes derivadas se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga *Eppendorf* modelo 5804-R a 4.000 rpm durante 5 minutos cuando se trataba de volúmenes inferiores a 50 ml. Para cultivos de mayor volumen, las células se recogían mediante filtración por vacío a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (*Millipore* HA).

Cuando por razones experimentales se requería transferir las células a un medio suplementado con una fuente de nitrógeno diferente a la utilizada para su cultivo, las células recogidas mediante alguno de los métodos descritos anteriormente se lavaban con medio BG11* carente de fuente nitrogenada (BG11₀). En el caso de las células recogidas por centrifugación, éstas se resuspendían en medio BG11₀, se centrifugaban y se descartaba el sobrenadante, repitiéndose el proceso dos veces. Las células recogidas por filtración se lavaban en el filtro haciendo pasar por el mismo el doble del volumen de cultivo de medio BG11₀.

2.1.1.4. Experimentos de inducción del desarrollo de heterocistos

El desarrollo de heterocistos se inducía mediante la eliminación de la fuente de nitrógeno combinado del medio de cultivo en el que estuviesen creciendo las cianobacterias. En este tipo de experimentos, las células de *Nostoc* sp PCC 7120 o de las estirpes mutantes derivadas se cultivaban a 30°C en presencia de NH₄Cl 6 mM y TES-NaOH 12 mM (pH 7,5), con los antibióticos correspondientes, en condiciones de gaseo con una mezcla de aire enriquecida en CO₂ al 1% (v/v), y bajo iluminación continua de intensidad 75 µE·m⁻²·s⁻¹. Cuando el cultivo alcanzaba 3-6 µg Chl·ml⁻¹, se recogía una muestra de 50 ml de células, que correspondía al tiempo 0 horas. A continuación, el resto de células del cultivo se recogían por filtración a temperatura ambiente, se lavaban con medio BG11₀, y se reinoculaban en un volumen de BG11₀, suplementado con NaHCO₃ 10 mM, similar al volumen del que procedían. Posteriormente, se recogían muestras de 50 ml a varios tiempos hasta alcanzar las 24 horas, tiempo en el que el proceso de diferenciación de heterocistos se ha completado en estas condiciones de laboratorio.

2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Las estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) empleadas en este trabajo y las características más relevantes de su genotipo se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Estirpes de *E. coli* utilizadas.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5α	F ⁻ <i>supE44 hsdR17</i> (r _k -m _k +) <i>recA1 girA96</i> (Nal ^r) <i>endA1 thi-1 relA1</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) (Ø80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>U169</i> .	(Hanahan, 1983)
BL21-(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R]	<i>Agilent Technologies</i>
HB101	F ⁻ <i>hsdS20</i> (r _B -m _B -) <i>leu supE44 ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB</i> .	(Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)
ED8654	<i>lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>recA56 mcrA1 metB1 lacY galk2 galT22 trpR55</i> .	(Murray et al., 1977)

2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo

Las estirpes de *E. coli* se cultivaban en medio rico Luria-Bertani (LB*) (Sambrook y Russell, 2001). Para la preparación de medio sólido se añadía agar a una concentración final de 1,5% (p/v). El medio se esterilizaba en autoclave.

Para cultivos líquidos a pequeña escala se utilizaban tubos de 20 ml de capacidad conteniendo 3 ml de cultivo, y se incubaban a 37°C con agitación orbital a 200 rpm. Por su parte, los cultivos en medio sólido se incubaban a 37°C en cajas de Petri.

En caso de ser necesaria la presencia de antibióticos en el medio, éstos se suplementaban a las siguientes concentraciones finales: estreptomicina (Sm) 25 µg·ml⁻¹, espectinomicina (Sp) 100 µg·ml⁻¹, kanamicina (Km) 50 µg·ml⁻¹, ampicilina (Ap) 50 µg·ml⁻¹ y cloranfenicol (Cm) 30 µg·ml⁻¹.

2.1.2.3. Métodos de recogida y lavado de células

Para la recogida de volúmenes hasta 1,5 ml, las células se centrifugaban en una microcentrífuga *Labnet* modelo *spectrafuge-24D* a 13.000 rpm durante un minuto. Para volúmenes de 1,5 a 50 ml, las células se centrifugaban en una centrífuga *Eppendorf* modelo *5804-R* a 4.000 rpm durante 5 minutos, y para volúmenes superiores a 50 ml se utilizaba la centrífuga *Beckman Coulter Avanti J-25* con rotor *JA 25.50* a 6.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado de células obtenido se lavaba varias veces con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y se procesaba inmediatamente, o se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C.

2.2. Métodos de manipulación y análisis de DNA

2.2.1. Plásmidos utilizados

2.2.1.1. Plásmidos no construidos en este trabajo

En este trabajo se han utilizado una serie de plásmidos que no han sido generados durante el desarrollo del mismo (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pAVN1	Fragmento de DNA conteniendo <i>nsrR1</i> , obtenido por PCR con los cebadores 197 y 198 (véase Tabla 2.5), digerido con XbaI, y clonado en pZE12-luc.	Ap	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
pCSRO	Vector movilizable derivado de pCSV3 conteniendo el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	Sm Sp	(Merino-Puerto <i>et al.</i> , 2010)
pCSV3	Vector movilizable por conjugación.	Sm Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006)
pELV16	Fragmento de DNA conteniendo un segmento de la región de <i>nsiR3</i> con <i>nsiR3</i> delecionado, obtenido por PCR con los cebadores 127 y 128, y clonado en pSpark. La deleción de <i>nsiR3</i> se realizó mediante el procedimiento del "Megacebador" (apartado 2.2.6.2), utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 127 y 128, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 129 y 130.	Ap	E. Olmedo-Verd (nuestro laboratorio)
pELV17	Fragmento de DNA conteniendo un segmento de la región de <i>nsiR3</i> con <i>nsiR3</i> delecionado, obtenido por digestión de pELV16 con BamHI, y clonado en pCSRO digerido con la misma enzima.	Sm Sp	E. Olmedo-Verd (nuestro laboratorio)
pELV73	Plásmido derivado de pCSAM147 (Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2009), un derivado de pCSEL21 (Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006), en el que se ha clonado entre los sitios únicos ClaI y EcoRV un fragmento de 700 pb (amplificado utilizando los oligonucleótidos 451 y 596) que comprende desde la posición -200 con respecto al TSS de <i>all1871</i> hasta el último codón de este gen que fue sustituido por el sitio de restricción EcoRV, quedando la traducción de All1871 en fase con la proteína GFPmut2.	Ap	E. Olmedo-Verd (nuestro laboratorio)
pELV75	Plásmido movilizable derivado de pCSV3, conteniendo en el sitio único EcoRI la fusión de <i>all1871</i> con el gen <i>gfp-mut2</i> de pELV73.	Sm Sp	E. Olmedo-Verd (nuestro laboratorio)
pET-28a(+)	Vector para la expresión de proteínas con etiquetas de histidinas.	Km	Novagen
pJV300	Plásmido de bajo número de copias derivado de pZE12-luc, a partir del que se transcribe un RNA de 50 nucleótidos.	Ap	(Sittka <i>et al.</i> , 2007)
pMBA37	Plásmido derivado de pCSEL24 (Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006), para la expresión de transcritos desde el promotor <i>trc</i> (Amann <i>et al.</i> , 1988). Contiene sitios únicos NsiI y XhoI, para clonación, seguidos del terminador T1 del gen <i>rrnB</i> de <i>E. coli</i> . Este plásmido contiene aproximadamente 2 kb de DNA de la región <i>nucA-nuiA</i> (<i>all7362-alr7361</i>) del plásmido alfa de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120. Todos los plásmidos derivados de pCSEL24 se integran en el plásmido alfa mediante recombinación homóloga.	ApSmSp	M. Brenes-Álvarez (nuestro laboratorio)

Materiales y Métodos

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pRL278	Vector movilizable por conjugación utilizado para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120. Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	Km	(Black <i>et al.</i> , 1993)
pRL443	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Ap	(Elhai y Wolk, 1988a)
pRL623	Vector derivado de ColK, portador de los genes <i>mob</i> y los genes de metilasas que metilan sitios Aval, Avall y Avalll.	Cm	(Elhai <i>et al.</i> , 1997)
pSAM221	Plásmido replicativo en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 derivado de pSAM200 (Ionescu <i>et al.</i> , 2010). Contiene un <i>polylinker</i> con sitios únicos ClaI y XhoI insertado en el único sitio EcoRI de pSAM200.	Sm Sp	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
pSAM303	Plásmido derivado de pCSEL24 (Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006), conteniendo sitios únicos EcoRI, ClaI, XhoI y SacI. Este plásmido contiene aproximadamente 2 kb de DNA de la región <i>nucA-nuiA</i> (<i>all7362-alr7361</i>) del plásmido alfa de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120. Todos los plásmidos derivados de pCSEL24 se integran en el plásmido alfa mediante recombinación homóloga.	Ap Sm Sp	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pSAM318	Plásmido conteniendo un segmento de la región de <i>all1871</i> con la parte central del gen <i>all1871</i> delecionada, obtenido por PCR con los cebadores 162 y 165, y clonado en pSpark. La deleción de la parte central de <i>all1871</i> se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador”, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 162 y 165, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 163 y 164, que generan un sitio único XhoI.	Ap	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pSAM319	Plásmido conteniendo un segmento de la región de <i>nsrR1</i> con <i>nsrR1</i> delecionada, obtenido por PCR con los cebadores 170 y 173, y clonado en pSpark. La deleción de <i>nsrR1</i> se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador”, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 170 y 173, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 171 y 172.	Ap	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
pSAM324	Plásmido conteniendo un segmento de la región de <i>all1871</i> con la parte central del gen <i>all1871</i> delecionada, obtenido por digestión de pSAM318 con BamHI, y clonado en pCSRO digerido con la misma enzima.	Sm Sp	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pSAM325	Plásmido conteniendo un segmento de la región de <i>nsrR1</i> con <i>nsrR1</i> delecionada, obtenido por digestión de pSAM319 con BamHI, y clonado en pCSRO digerido con la misma enzima.	Sm Sp	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
pSAM326	Plásmido derivado de pSAM324 con la casete CK3, que confiere resistencia a neomicina, clonada en el sitio único XhoI generado en la deleción de la parte central del gen <i>all1871</i> .	Sm Sp Km	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pSAM329	Plásmido conteniendo <i>nsrR1</i> bajo el control del promotor de <i>petE</i> , obtenido por PCR con los cebadores 184 y 299, y clonado en pSpark. La fusión entre el promotor de <i>petE</i> y <i>nsrR1</i> se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador”, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 184 y 299, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 185 y 186.	Ap	(Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)
pSpark	Vector para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR.	Ap	Canvax Biotech

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pT7-7120	Plásmido que contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 clonado bajo el control de un promotor dependiente de la RNA polimerasa del fago T7 en pUC19.	Ap	(Vioque, 1997)
pXG-0	Plásmido derivado de pXG-10-SF pero con el gen <i>sfgfp</i> deletado.	Cm	(Urban y Vogel, 2007)
pXG-10-SF	Plásmido de bajo número de copias para la generación de fusiones <i>sfgfp</i> con genes monocistrónicos o con el primer gen de un operón de promotor conocido.	Cm	(Corcoran et al., 2012)
pXG-30-SF	Plásmido de bajo número de copias para la generación de fusiones <i>sfgfp</i> con genes pertenecientes a una región de mRNA policistrónico.	Cm	(Corcoran et al., 2012)
pZE12-luc	Plásmido de alto número de copias para la clonación de genes que codifican sRNAs.	Ap	(Lutz y Bujard, 1997)

2.2.1.2. Plásmidos contruidos en este trabajo

Para la realización de este trabajo se construyeron una serie de plásmidos (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Plásmidos utilizados contruidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia
pIAE2	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR (UTR, " <i>Untranslated region</i> ") y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína All1318, obtenido por PCR con los cebadores 203 y 204, digerido con Nsil y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE6	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína All1873, obtenido por PCR con los cebadores 211 y 212, digerido con Nsil y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE8	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr2933, obtenido por PCR con los cebadores 238 y 210, digerido con Nsil y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-30-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE9	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína All1871, obtenido por PCR con los cebadores 247 y 248, digerido con Nsil y XbaI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con Nsil y NheI.	Cm
pIAE10	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Asl4325, obtenido por PCR con los cebadores 251 y 252, digerido con Nsil y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas. El cebador 251 introduce una mutación puntual, G a A, en dicho fragmento para cambiar el codón de inicio de la traducción GTG a ATG.	Cm
pIAE11 (Álvarez-Escribano et al., 2018)	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína NblA, obtenido por PCR con los cebadores 253 y 254, digerido con Nsil y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm

Plásmido	Descripción	Resistencia
pIAE12	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr0912, obtenido por PCR con los cebadores 201 y 237, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas. Se realizó una mutación puntual, G a A, en dicho fragmento para cambiar el codón de inicio de la traducción GTG a ATG mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 201 y 237, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 235 y 236.	Cm
pIAE13	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr1238, obtenido por PCR con los cebadores 249 y 250, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE17 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Fragmento de DNA conteniendo <i>nsrR1</i> bajo el control del promotor de <i>petE</i> , obtenido por digestión de pSAM329 con ClaI y XhoI, y clonado en pSAM221 digerido con las mismas enzimas.	Sm Sp
pIAE18	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr3684, obtenido por PCR con los cebadores 234 y 200, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-30-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE19	Fragmento de DNA conteniendo <i>nsiR3L</i> , obtenido por PCR con los cebadores 195 y 283, digerido con XbaI, y clonado en pZE12-luc.	Ap
pIAE20	Plásmido idéntico a PAVN1 pero con una mutación puntual, U a G, en la posición 51 de <i>NsrR1</i> (Mut-51).	Ap
pIAE22	Plásmido idéntico a pIAE9 pero con una mutación puntual, G a C, en la posición -13 de la región 5'UTR de <i>nbIA</i> (Comp-51).	Cm
pIAE24	Fragmento de DNA conteniendo <i>nsiR3L</i> bajo el control del promotor de <i>petE</i> , obtenido por PCR con los cebadores 299 y 300, digerido con ClaI y XhoI, y clonado en pSAM221 digerido con las mismas enzimas.	Sm Sp
pIAE26 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Plásmido idéntico a PAVN1 pero con una mutación puntual, C a G, en la posición 63 de <i>NsrR1</i> (Mut-63).	Ap
pIAE27 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Plásmido idéntico a PAVN1 pero con una mutación puntual, C a G, en la posición 66 de <i>NsrR1</i> (Mut-66).	Ap
pIAE28 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Plásmido idéntico a pIAE11 pero con una mutación puntual, G a C, en la posición -18 de la región 5'UTR de <i>nbIA</i> (Comp-63).	Cm
pIAE29 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Plásmido idéntico a pIAE11 pero con una mutación puntual, G a C, en la posición -21 de la región 5'UTR de <i>nbIA</i> (Comp-66).	Cm
pIAE30	Fragmento de DNA conteniendo el gen <i>all1871</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, obtenido por PCR con los cebadores 335 y 336, digerido con NcoI y XhoI, y clonado en pET-28a(+) digerido con las mismas enzimas.	Km
pIAE32 (Álvarez-Escribano <i>et al.</i> , 2018)	Fragmento de DNA conteniendo el gen <i>nbIA</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, obtenido por PCR con los cebadores 358 y 359, digerido con NdeI y XhoI, y clonado en pET-28a(+) digerido con las mismas enzimas.	Km
pIAE48	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína PutA, obtenido por PCR con los cebadores 645 y 646, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas. Se realizó una mutación puntual, G a A, en dicho fragmento para cambiar el codón de inicio de la traducción GTG a ATG mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 645 y 646, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 647 y 648.	Cm

Plásmido	Descripción	Resistencia
pIAE49	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr2431, obtenido por PCR con los cebadores 649 y 650, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE50	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína AlI2806, obtenido por PCR con los cebadores 651 y 652, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE51	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína AlI3327, obtenido por PCR con los cebadores 653 y 654, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE52	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína AlI3410, obtenido por PCR con los cebadores 655 y 656, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE54	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr0607, obtenido por PCR con los cebadores 659 y 660, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE55	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr2372, obtenido por PCR con los cebadores 661 y 662, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-10-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE57	Fragmento de DNA conteniendo la región 5'UTR y la secuencia que codifica los primeros 20 aminoácidos de la proteína Alr3865, obtenido por PCR con los cebadores 665 y 664, digerido con NsiI y NheI, y clonado en fase con el gen <i>sfgfp</i> en el plásmido pXG-30-SF digerido con las mismas enzimas.	Cm
pIAE61	Plásmido idéntico a pIAE19 pero con una mutación puntual, G a C, en la posición 14 de NsiR3 (Mut-14).	Ap
pIAE62	Plásmido idéntico a pIAE48 pero con una mutación puntual, C a G, en la posición -17 de la región 5'UTR de <i>putA</i> (Comp-14*17).	Cm
pIAE63	Plásmido idéntico a pIAE49 pero con una mutación puntual, C a G, en la posición -53 de la región 5'UTR de <i>alr2431</i> (Comp-14*53).	Cm
pIAE65	Fragmento de DNA conteniendo la región de <i>all1871</i> , obtenido por PCR con los cebadores 247 y 735, digerido con NsiI y XhoI, y clonado tras el promotor <i>trc</i> en el plásmido pMBA37, digerido con las mismas enzimas.	Sm Sp

2.2.2. Aislamiento de DNA

2.2.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

El DNA plasmídico se aislaba de cultivos de 3-5 ml de *E. coli* incubados durante 18-24 horas a 37°C con agitación orbital a 200 rpm en medio rico LB* haciendo uso del kit comercial *Isolate II Plasmid Mini Kit* (Bioline), basado en la lisis alcalina de las células.

2.2.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

El aislamiento de DNA total de *Nostoc* sp PCC 7120 se realizaba siguiendo el método descrito en (Cai y Wolk, 1990). Para ello, células procedentes de 25-50 ml de cultivo se recogían por centrifugación y se resuspendían en 400 µl de tampón T_{1/10}E*. A la suspensión celular se le añadía un volumen equivalente a 150 µl de perlas de vidrio (0,25-0,3 mm de diámetro), 20 µl de SDS 10% (p/v), y 400 µl de una mezcla de fenol (pH 8,0):cloroformo (1:1, [v:v]). La mezcla resultante se sometía a cuatro ciclos de agitación con vórtex (1 minuto) e incubación en hielo (1 minuto). El lisado se centrifugaba a 16.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante se sometía a sucesivas extracciones con un volumen de fenol (pH 8,0) (1 vez), un volumen de fenol (pH 8,0):cloroformo (1:1, [v:v]) (2 veces), y un volumen de cloroformo (1 vez). Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa final se precipitaban mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, y 0,1 volúmenes de acetato potásico 3 M (pH 5,2), incubándose durante 1 hora a -20°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaban a 16.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C, el precipitado se lavaba con etanol 70% (v/v), y se dejaba secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de ácidos nucleicos se resuspendía en 30 µl de agua desionizada o en tampón T_{1/10}E*.

2.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación y análisis de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001) de concentración variable entre el 0,7-2% (p/v) preparados en tampón TBE* diluido al 50%. Para la detección del DNA se añadía al gel bromuro de etidio (3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) a una concentración final de 1 µg·ml⁻¹. Antes de cargar las muestras en el gel, a éstas se les añadía 1/5 de su volumen de tampón de carga DNA 5X*. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales de electroforesis (*Bio-Rad*) con tampón TBE* diluido al 50%, a 80-120 voltios durante un tiempo variable. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis se cargaban 3 µl de un marcador conteniendo fragmentos de DNA de peso molecular conocido (*2-Log DNA ladder, New England Biolabs*). Finalmente, el DNA se visualizaba iluminando los geles con luz ultravioleta.

2.2.4. Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA en disolución, o separados por electroforesis en geles de agarosa, se realizaba con el *kit* comercial *Isolate II PCR and Gel Kit (BioLine)*.

2.2.5. Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA de las muestras se determinaba espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop* modelo *ND-100*.

2.2.6. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

2.2.6.1. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un termociclador *T personal* (*Whatman-Biometra*). La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 20 a 50 μ l, en una mezcla de reacción conteniendo 1–10 ng de DNA molde; 0,2 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP); 0,4 μ M de cada oligonucleótido y la DNA polimerasa con su tampón correspondiente. Como DNA molde se utilizaba DNA genómico aislado de cianobacterias, DNA plasmídico obtenido de *E. coli*, o colonias aisladas de cianobacterias o *E. coli*. El programa de amplificación utilizado constaba de una etapa de desnaturalización inicial de 0,5-3 minutos a 95°C o 98°C, dependiendo de la DNA polimerasa utilizada, seguido de 30-35 ciclos de amplificación. Cada uno de estos ciclos tenía una etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C o 98°C, una etapa de apareamiento de 15 segundos a una temperatura variable que dependía de los oligonucleótidos utilizados, y una etapa de extensión a 72°C durante un tiempo variable que dependía del tamaño del fragmento a amplificar y de la DNA polimerasa utilizada. El programa terminaba con una incubación de 5 minutos a 72°C. El resultado de la reacción de PCR se analizaba mediante electroforesis en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.2.3. La DNA polimerasa utilizada dependía del propósito de cada experimento. Así, para la amplificación rutinaria de secuencias se utilizaba la DNA polimerasa My Taq™ (*Bioline*), para la amplificación de alta fidelidad se utilizaba la enzima iProof High Fidelity (*Bio-Rad*), y para la amplificación en presencia de un dNTP radioactivo (apartado 2.3.4) se utilizaba la DNA polimerasa BioTaq™ (*Bioline*). Todas las DNA polimerasas se utilizaban según las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores en las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR (apartado 2.2.6.2) se detallan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

#	Secuencia 5'-3'	Uso
23	AAAGCCACTTCAGATTTCCCAGGTAGA	Verificación de la estructura cromosómica de la estirpe mutante Δ nsiR3.
125	TCTGGATCATACTCATAGCCG	
126	TCAAACGAAATGGCGAGATG	
127	GGATCCTCTGGGGTAATACTGCAC	Construcción de la estirpe mutante Δ nsiR3.
128	GGATCCATTTCGTTCCAGAGTTAGAG	
129	ATTGCACTCATGCCAGACTTGAGGCTG	
130	AGTCTGGCATGAGTGCAATTGCCTGACTG	

Materiales y Métodos

#	Secuencia 5' - 3'	Uso
158	CATCTGCCTCTGCCTCTTCTG	Verificación de la estructura cromosómica de la estirpe mutante <i>ΔnsrR1</i> .
159	CCTTCCTTGTAGGCAGTCGAG	
162	GGATCCGATGGTGGTACATCCAG	
163	TTGATCAAACTCGAGGATTTCGGCATCGGTG	Construcción de la estirpe mutante <i>all1871::CK3</i> . Para la verificación de la estructura cromosómica de esta estirpe se utilizaron los cebadores 162 y 180.
164	GAAATCCTCGAGTTGATCAACTCCATCAACC	
165	GGATCCAGTTTACCCATATCG	
180	CAGCCAAGGTTTTGTTAACAG	
170	GGATCCAACAGACCAACGCTGAG	
171	TAAACGACTCGAGGTAATCAGCCTCTATC	Construcción de la estirpe mutante <i>ΔnsrR1</i> .
172	TGATTACCTCGAGTCGTTTTACGTGGTGTC	
173	GGATCCTAGTCTCACACCATTAGG	
184	CTCGAGACACCACGTAAACGAC	Clonación de <i>nsrR1</i> bajo el promotor de <i>petE</i> .
185	TAAATGAAATAAAGAAAAGTTGCCCGTTGC	
186	GCAACTTTTCTTTATTTCATTTTAAATAAAATCGACAC	
299	GTTTTATCGATGGACTCAGAACACAGTACTC	
189	CGCACTGACCGAATTCATTAA	
190	GTGCTCAGTATCTTGTTATCCG	Amplificación de pZE12-luc.
191	GTGCCACCTGACGTCTAAGA	Comprobación de las clonaciones en pZE12-luc.
192	TCGTTTTATTTGATGCCCTCTAGA	
193	TGGGATATATCAACGGTGGT	Comprobación de las fusiones traduccionales a sfGFP en pXG-10-SF o pXG-30-SF.
194	GAATTGGGACAACCTCCAGTG	
195	5'P-AGGTCTACCTGGGAAATCTG	Amplificación del gen <i>nsiR3L</i> para su clonación en pZE12-luc.
283	GTTTTTCTAGAGAAACTCAAACGAAATGGC	
197	5'P-AAGAAAAGTTGCCCGTTGC	Amplificación del gen <i>nsrR1</i> para su clonación en pZE12-luc.
198	GTTTTTCTAGACAGAGACACCAGTAAACGACT	
234	GTTTTATGCATCAAGTCATCTCCAGACAAAAT	Amplificación de la región de <i>alr3684</i> para su clonación en pXG-30-SF.
200	GTTTTGCTAGCCACCTGCTCTTGAGACTTGC	
201	GTTTTATGCATGAGTCCCTCCAAACTGAAATTTT	Cambio del codón de inicio de la traducción GTG a ATG en <i>alr0912</i> . Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 201 y 237, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 235 y 236. Los cebadores 201 y 237 también fueron utilizados para amplificar la región de <i>alr0912</i> para su clonación en pXG-10-SF.
235	CGGAACATAAAATGGCTAGTATTGATAA	
236	TTATCAATACTAGCCATTTTTAGTTCCGCCG	
237	GTTTTGCTAGCAGCTTGGGGATTGATACTT	
203	GTTTTATGCATGAGTCCCTCCAAACTGAAATTTT	
204	GTTTTGCTAGCCTTGGCTTCAGTGGTAAACG	Amplificación de la región de <i>all1318</i> para su clonación en pXG-10-SF.
238	GTTTTATGCATTCCTGGATTGTAGCGATCCG	Amplificación de la región de <i>alr2933</i> para su clonación en pXG-30-SF.
210	GTTTTGCTAGCCGGATTACCAAAGCAATTCCC	
211	GTTTTATGCATATACCCGGGTAAGGCCATCG	Amplificación de la región de <i>alr1873</i> para su clonación en pXG-10-SF.
212	GTTTTGCTAGCCTTCAGCTTTTTGTGCAGTTC	
247	GTTTTATGCATTCCTTGCTAACCAGGGG	Amplificación de la región de <i>all1871</i> para su clonación en pXG-10-SF.
248	GTTTTCTAGAGGAAGCTTTGAGGATTTCCG	
249	GTTTTATGCATATTTCAGGATGCAGAACTGATTTAG	Amplificación de la región de <i>alr1238</i> para su clonación en pXG-10-SF.
250	GTTTTGCTAGCGTAAATATCAAAGGCGCGTTTCG	
251	GTTTTATGCATGTACAGAGCCTGTGTTGTAGTAACTCCAAAAAC	Amplificación de la región de <i>asl4325</i> para su clonación en pXG-10-SF.
252	CAAGAGCAAAAGCTATGTCAGTCG	
253	GTTTTATGCATACAGAGGAATAATCAACAATATGGG	Amplificación de la región de <i>nblA</i> para su clonación en pXG-10-SF.
254	GTTTTGCTAGCGGTGGCAAATGAGCGAATGC	
295	TTTAACCTGATATGAGAAGACAACGC	Mutación puntual (Mut-51) en <i>NsrR1</i> . Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 191 y 192, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 295 y 296.
296	TCATATCGAGTTAAACCCGGCTGCG	

#	Secuencia 5' - 3'	Uso
300	GTTTTTCTCGAGGAACTCAAACGAAATGGCG	Clonación de <i>nsiR3L</i> bajo el promotor de <i>petE</i> . Se amplificó un segmento de DNA mediante el procedimiento del "Megacebador" usando como cebadores externos los oligonucleótidos 299 y 300, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 301 y 302.
301	TAAATGAAATAAGGTTCTACCTGGGAAATCTG	
302	CAGGTAGAACCTTATTTTCATTTTAAATAAAATCGACACC	
303	TTCTCATTCTGAGGAAACCCAAATGTC	Mutación puntual (Comp-51) en la región 5'UTR del mRNA de <i>all1871</i> mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 247 y 248, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 303 y 304.
304	TTCTCTGGAATGAGAAGATTGAGAAAAAG	
315	GAAGAGAACGCTAAAAGAATCAACTAGACC	Mutación puntual (Mut-63) en NsrR1 mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 191 y 192, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 315 y 316.
316	GCGTTCTCTTCTCATATAGAGTTAAAACCC	
317	GACAAAGCTAAAAGAATCAACTAGACCAGC	Mutación puntual (Mut-66) en NsrR1 mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 191 y 192, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 317 y 318.
318	CTTTTAGCTTGTCTTCTCATATAGAGTTAAAACCC	
329	GCGTTCTCTTTTAGGAGTCTGTTATGAACC	Mutación puntual (Comp-63) en la región 5'UTR del mRNA de <i>nblA</i> mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 253 y 254, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 329 y 330.
330	CCTAAAAGAAGACGCGTAAAGGTTATGTGC	
331	CCTTTACGCTTGTCTTTTAGGAGTCTG	Mutación puntual (Comp-66) en la región 5'UTR del mRNA de <i>nblA</i> mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 253 y 254, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 331 y 332.
332	GACAAAGCGTAAAGGTTATGTGCG	
335	GTTTTCCATGGCTCACTTTAGCACTCTCCGC	Amplificación de <i>all1871</i> para su clonación en el vector pET-28a(+).
336	GTTTTCTCGAGTTGCAATACCACTTCACATTG	
341	TAATACGACTCACTATAGG	Comprobación de las clonaciones en el vector pET-28a(+).
342	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
358	GTTTTCATATGAACCAACCAATCGAATTGTCATTAG	Amplificación de <i>nblA</i> para su clonación en el vector pET-28a(+).
359	GTTTTCTCGAGCTATGCCGGAGTGGAACCAGAATC	
418	CCTGTATGAATATGTAAAGAAAAGTTGCC	Mutación en el sitio de unión de NtcA (TAC a ATG) de la región promotora de NsrR1 mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 153 y 183, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 418 y 419.
419	CAATATTCTACAGGCAACACAG	
153	GAGTAAACCCGGCTGCGTATTTCCC	
183	ATCGATACTCTCGCAACAACG	
420	AATTGACTCAATTTATACTATTTTAATTTTTTTAGTCG	Mutación en el sitio de unión de NtcA (GTG a CAC) de la región promotora de NsiR3 mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 23 y 469, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 420 y 421.
421	AAATTGAGTGCAATTATTTTAATAATGCCAGACTTGAGG	
469	CATCTTCTAGCCTTTTGTTC	
451	GTTTTATCGATAGTTGCGGCAATGTACGAAGC	Construcción de la fusión All1871::GFPmut2.
596	GTTTGATATCTTGCAATACCAACTTCACATTGGC	
569	GTTTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGAAAAGTTGCC	Amplificación del molde para la transcripción <i>in vitro</i> de NsrR1.
570	GTTTTGGATCCTTAAAAAAGACCAGCTTCCAC	
571	GTTTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGACAGAGGAATAAT	Amplificación del molde para la transcripción <i>in vitro</i> de la región 5'UTR del mRNA de <i>nblA</i> .
572	GTTTTGGATCCGGTGGCAATGAGCGAATG	
597	GAATTCATAACGACTCACTATAGGGTCCCTGCTAACCCAGGGG	Amplificación del molde para la transcripción <i>in vitro</i> de la región 5'UTR del mRNA de <i>all1871</i> .
598	GGAAGCTTTGAGGATTTCCG	

#	Secuencia 5' - 3'	Uso
645	GTTTTATGCATGTCACAATAGAAACACGG	Cambio del codón de inicio de la traducción GTG a ATG en <i>putA</i> . Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 645 y 646, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 647 y 648. Los cebadores 645 y 646 también fueron utilizados para amplificar la región de <i>putA</i> para su clonación en pXG-10-SF.
646	GTTTTTGCTAGCTGTCTAGCAATTTCTTGAG	
647	TATCAATGGTATTACAAGTACAAACC	
648	GTAATACCAATTGATAGGAACCTCTG	
649	GTTTTATGCATATTGCTGTGACTTTCCAGG	Amplificación de la región de <i>alr2431</i> para su clonación en pXG-10-SF.
650	GTTTTTGCTAGCCCCCTTCATTTCCGTATTAGCG	
651	GTTTTATGCATATATAAAGAATAAACATCACTAATTTTAG	Amplificación de la región de <i>all2806</i> para su clonación en pXG-10-SF.
652	GTTTTTGCTAGCGGAAAAAGGTAGCTTTTCAC	
653	GTTTTATGCATAATTGTTGCATTGACACAATCTGG	Amplificación de la región de <i>all3327</i> para su clonación en pXG-10-SF.
654	GTTTTTGCTAGCAAATTCAGAATGTAGCGTTGC	
655	GTTTTATGCATATGTAAGCGATTGGCAACTATCAGC	Amplificación de la región de <i>all3410</i> para su clonación en pXG-10-SF.
656	GTTTTTGCTAGCAGGATTTAAGGCTACACGTCG	
659	GTTTTATGCATATCGAAATCGTTACATAAACATTC	Amplificación de la región de <i>alr0607</i> para su clonación en pXG-10-SF.
660	GTTTTTGCTAGCGGCTTTGAATTTCTCAAAAC	
661	GTTTTATGCATAGATATTGTTGAGAATTGTATAG	Amplificación de la región de <i>alr2372</i> para su clonación en pXG-10-SF.
662	GTTTTTGCTAGCGACGGCTTCAACAGTACCG	
665	GTTTTATGCATAATCGGGCTTTAGTCAGCGTGC	Amplificación de la región de <i>all3865</i> para su clonación en pXG-30-SF.
664	GTTTTTGCTAGCCTGACAACGAAATTCAGCGC	
689	CTACCTGGCAAACTCTGAAGTGGCTTTGCC	Mutación puntual (Mut-14) en NsiR3 mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 704 y 283, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 689 y 690.
690	GATTTGCCAGGTAGAACCTGTGCTCAG	
704	5'P-AGGTCTACCTGGCAAACTCTG	
718	CTGAAATTAAGTCAGGAGTTCCTATC	Mutación puntual (Comp-14*17) en la región 5'UTR del mRNA de <i>putA</i> mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 645 y 646, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 718 y 719.
719	CCTGACTTAATTTTCAGACTTTATATATAAAG	
720	GACTTTGCCAGGTACACGGTCTAGAAC	Mutación puntual (Comp-14*53) en la región 5'UTR del mRNA de <i>alr2431</i> mediante el procedimiento del "Megacebador". Se usaron como cebadores externos los oligonucleótidos 728 y 650, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 720 y 721.
721	GTACCTGGCAAAGTCACAGCAATATGCATG	
728	GTTTTATGCATATTGCTGTGACTTTGCCAGG	
735	GTTTTCTCGAGTCATTGCACCAGATGGTTAC	Clonación de <i>all1871</i> bajo el promotr <i>trc</i> .

Los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos aparecen subrayados. Los nucleótidos que han sido cambiados con respecto a la secuencia silvestre se señalan en rojo. La secuencia del promotor dependiente de la polimerasa del fago T7 en los oligonucleótidos 569, 571 y 597 se resalta en negrita. La fosforilación en el extremo 5' monofosfato de los oligonucleótidos 195, 197 y 704 se indica con 5'P.

2.2.6.2. Procedimiento del "Megacebador"

Para los experimentos desarrollados en este trabajo en los que fue necesario introducir alteraciones de secuencia en el DNA mediante mutagénesis dirigida, o fusionar dos fragmentos de DNA, se usó el procedimiento del "Megacebador" (Ausubel *et al.*, 2006), que consta de tres reacciones de PCR.

En los casos en los que se desea introducir alteraciones de secuencia en el DNA (Figura 2.1A), en las dos primeras reacciones de PCR, independientes entre sí, se utiliza como molde DNA conteniendo la secuencia en la que se pretende introducir el cambio.

Como cebadores, en cada una de estas reacciones se utiliza un oligonucleótido que incorpora la mutación deseada, y un oligonucleótido externo situado en un extremo del fragmento. Los oligonucleótidos mutagénicos, que se denominan solapantes, utilizados en estas reacciones son parcialmente complementarios entre sí, y los externos están situados en los extremos del fragmento de DNA que se va a clonar. Los productos de estas dos reacciones de PCR se resuelven mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.2.3) y se purifican (apartado 2.2.4). En la tercera reacción de PCR se emplea como molde una mezcla de los productos purificados de las dos reacciones anteriores, denominados “Megacebadores”, y como cebadores los dos oligonucleótidos externos. Las secuencias de los fragmentos amplificados con este procedimiento se comprueban mediante secuenciación (apartado 2.2.7).

Por su parte, en los casos en los que se desea fusionar dos fragmentos de DNA (Figura 2.1B), en las dos primeras reacciones de PCR se utiliza como molde DNA conteniendo las secuencias a fusionar. De este modo, cada una de estas dos reacciones de PCR independientes se realiza con cada uno de los moldes, usando como cebadores un oligonucleótido del extremo de la región a fusionar, que contiene una extensión complementaria al extremo de la región del otro fragmento de DNA a fusionar, y un oligonucleótido externo situado en el extremo del fragmento utilizado como molde. La tercera reacción de PCR se lleva a cabo como en el caso anterior.

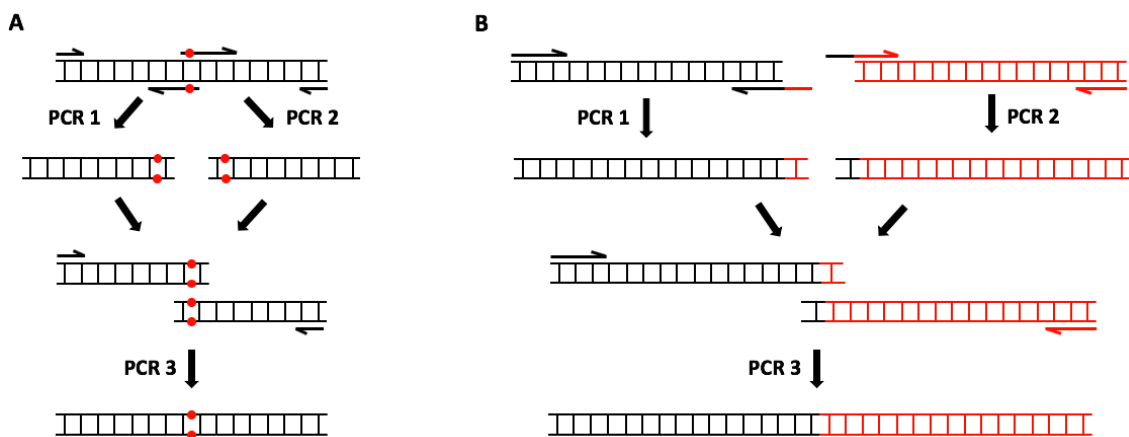


Figura 2.1 Procedimiento del “Megacebador”. (A) Esquema de la estrategia utilizada para introducir mutaciones puntuales en el DNA. La secuencia de DNA se amplifica con dos parejas de cebadores, cada una de las cuales amplifica desde un extremo del fragmento hasta la región a mutar, que se representa con un punto rojo. Los dos productos de amplificación obtenidos, que se solapan parcialmente, se mezclan, y se usan como molde para la tercera reacción de PCR con los cebadores externos. **(B) Esquema de la estrategia utilizada para la fusión de dos fragmentos de DNA.** Los dos fragmentos de DNA a fusionar, representados en rojo y negro, se amplifican con dos parejas de cebadores. Cada uno de los cebadores de la región a fusionar contiene una extensión complementaria a la región del otro fragmento de DNA a fusionar. Los dos productos de amplificación obtenidos, que se solapan parcialmente, se mezclan, y se usan como molde para la tercera reacción de PCR con los cebadores externos.

2.2.7. Secuenciación del DNA

Para la secuenciación de fragmentos de DNA, las muestras se enviaban a un servicio de secuenciación externo perteneciente a la empresa Secugen S.L. siguiendo las instrucciones proporcionadas por el mismo.

2.2.8. Tratamientos enzimáticos del DNA

2.2.8.1. Restricción del DNA

Para hidrolizar el DNA por secuencias específicas se empleaban endonucleasas de restricción suministradas por *New England Biolabs*. Habitualmente, las reacciones de digestión se llevaban a cabo a 37°C en un volumen de 20 µl, conteniendo 100-500 ng del DNA sustrato y 1 µl de enzima en el tampón recomendado por el fabricante, durante 12-15 horas, o durante 2 horas si las enzimas eran de calidad *High Fidelity*. Cuando era necesario, las enzimas se inactivaban por calor incubando la muestra 20 minutos a 65°C o 80°C, dependiendo de la enzima, o bien se eliminaban separándolas del producto de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.2.8.2. Desfosforilación del DNA

Para evitar la religación del vector en aquellas clonaciones en las que se insertaba un fragmento de DNA no seleccionable, era necesario eliminar el grupo fosfato de los extremos 5' del vector lineal. Para ello, se llevaba a cabo la desfosforilación del DNA en una reacción de 20 µl de volumen, añadiendo a 200-500 ng del DNA sustrato, procedente de una reacción de restricción, 1 unidad de fosfatasa alcalina *rAPid alkaline phosphatase (Roche)*, e incubando la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, la enzima se inactivaba por calor incubando a 75°C durante 2 minutos.

2.2.8.3. Ligación del DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA se utilizaba la DNA ligasa del bacteriófago T4, proporcionada por *New England Biolabs*. La reacción se llevaba a cabo en un volumen de 10 µl, conteniendo 20 ng de vector, y una cantidad de DNA inserto tal que la relación molar vector:inserto fuera de 1:5. La mezcla de reacción se suplementaba con el tampón proporcionado por el fabricante y con 1 unidad de DNA ligasa. A continuación, la mezcla de ligación se incubaba a 22°C durante 2 horas, tras lo cual se utilizaba para la transformación de *E. coli* mediante choque térmico (apartado 2.2.9.1).

2.2.9. Transferencia de DNA a bacterias

2.2.9.1. Transferencia de DNA a *E. coli* mediante transformación

Las células transformables de *E. coli* se prepararon según el método descrito en (Hanahan, 1983). Las células transformables de la estirpe DH5 α fueron adquiridas al Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja). Para la transformación genética por choque térmico se mezclaban 100 μ l de células transformables, previamente descongeladas en hielo, con un volumen de 1-5 μ l conteniendo 20-50 ng de la preparación de DNA transformante. La mezcla se incubaba 15 minutos en hielo, se sometía a un choque térmico durante 2 minutos a 42°C, y volvía a incubarse en hielo 5 minutos. A continuación, se añadía a las células 1 ml de medio LB* y se incubaban a 37°C durante 1 hora. Finalmente, la suspensión celular se sembraba en cajas de Petri que contenían medio LB* sólido suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes. Para la identificación de transformantes que hubieran incorporado el plásmido con inserto mediante ensayos de “complementación α ”, el medio se suplementaba además con 40 μ g·ml⁻¹ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (*Fermentas*) (Sambrook y Russell, 2001). En este caso, las colonias que contenían un plásmido con inserto aparecían de color blanco, mientras que las que incorporaban un plásmido sin inserto eran de color azul.

2.2.9.2. Transferencia de DNA a *E. coli* mediante electroporación

Las células electroporables eran adquiridas al Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja). Para la transferencia de material genético a *E. coli* por electroporación se mezclaban 100 μ l de células electroporables, previamente descongeladas en hielo, con un volumen de 1-5 μ l conteniendo 20-50 ng de la preparación de DNA transformante. La mezcla se transfería a cubetas de electroporación de 2 mm de separación entre electrodos (*Cell Projects*), previamente enfriadas en hielo, y se procedía a la electroporación utilizando un electroporador *MicroPulser* (*Bio-Rad*). Inmediatamente, se añadía a las células 1 ml de LB* y se incubaban a 37°C durante 1 hora. Finalmente, la suspensión celular se sembraba en cajas de Petri que contenían medio LB* sólido suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes.

2.2.9.3. Transferencia de DNA a *Nostoc* sp. PCC 7120 mediante conjugación triparental

La transferencia de DNA a *Nostoc* sp. PCC 7120 se realizaba siguiendo un protocolo de conjugación triparental, basado en el uso de un plásmido conjugativo de amplio espectro (Elhai y Wolk, 1988a). En este proceso intervienen dos estirpes de *E. coli* y la cianobacteria receptora *Nostoc* sp. PCC 7120. Una de las estirpes de *E. coli* (HB101) porta el plásmido a transferir, también llamado plásmido cargo, que contiene el fragmento de DNA que se desea introducir en la cianobacteria, y que posee un origen de transferencia conjugativa denominado sitio *bom* (*basis of mobilization*). Además, esta estirpe porta el vector auxiliar pRL623, que contiene el gen *mob*, que determina la endonucleasa que corta el plásmido cargo en el sitio *bom*, proceso esencial para que se produzca la movilización. El vector pRL623 también contiene genes que codifican metilasas que metilan sitios Aval, Avall y Avalll (Elhai *et al.*, 1997). Las metilaciones catalizadas por estas enzimas protegen al plásmido cargo frente a las endonucleasas de restricción de *Nostoc* sp. PCC 7120, evitando así su degradación una vez introducido en la cianobacteria receptora. Por su parte, una segunda estirpe de *E. coli* (ED8654) porta el plásmido conjugativo pRL443 (Elhai y Wolk, 1988a), que contiene los genes necesarios para la movilización del plásmido cargo a la cianobacteria receptora.

Para realizar la conjugación, la estirpe de *E. coli* HB101 (pRL623) se transformaba con el plásmido cargo mediante el proceso de transformación descrito en el apartado 2.2.9.1. Tras ello, se inoculaban cultivos de las dos estirpes de *E. coli*, que se incubaban a 37°C con agitación a 200 rpm durante 12-15 horas. Dado que en el momento de la conjugación las células deben estar en fase exponencial, alícuotas de 350 µl de cultivo de cada una de las estirpes de *E. coli* se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de medio LB* estéril suplementado con los antibióticos adecuados, que se incubaban a 37°C con agitación a 200 rpm durante 2,5 horas. Posteriormente, las células se recogían y se lavaban dos veces mediante centrifugación y resuspensión suave con 10 ml de medio LB* estéril para eliminar los antibióticos. A continuación, los precipitados celulares se resuspendían suavemente en 5 ml de medio LB*, se combinaban ambas estirpes de *E. coli*, y las células se volvían a recoger por centrifugación, resuspendiendo el precipitado suavemente en 60 µl de medio LB*. Esta mezcla se incubaba a 30°C durante 2,5 horas sin agitación. Tras la incubación, la mezcla de estirpes de *E. coli* se combinaba en un volumen máximo de 200-300 µl con una suspensión celular de *Nostoc* sp. PCC 7120 que contenía 10 µg de clorofila si el plásmido cargo era integrativo, o 1 µg de clorofila si el plásmido cargo era replicativo. La mezcla resultante se extendía sobre un filtro estéril de nitrocelulosa de 0,45 µm (*Millipore*) dispuesto sobre una caja de Petri con medio BG11* suplementado con LB* al 5% (v/v). Las cajas de Petri se incubaban a 30°C con baja intensidad de luz durante 2 horas, y posteriormente en condiciones habituales de cultivo durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, los filtros se transferían a cajas

de Petri con medio BG11*, que se incubaban durante 24 horas en las mismas condiciones. Tras estas 24 horas, los filtros se transferían a cajas de Petri con medio BG11* suplementado con los antibióticos adecuados. Las cajas de Petri se incubaban en las mismas condiciones, y cada 2-3 días se cambiaban los filtros a una nueva caja de Petri con medio BG11* suplementado con los antibióticos adecuados. Este proceso se repetía hasta que desaparecía el fondo de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 sensibles a los antibióticos, y comenzaban a aparecer, normalmente tras 7-10 días, colonias resistentes a los antibióticos. Por último, al objeto de aislar colonias de cianobacterias limpias de las células de *E. coli* empleadas en la conjugación, las células de *Nostoc* sp. PCC 7120 resultantes se sembraban para aislar colonias en cajas de Petri con medio BG11* suplementado con los antibióticos adecuados. Este proceso se repetía dos veces más a partir de las colonias aisladas obtenidas en cada resiembra.

La generación de estirpes mutantes de *Nostoc* sp. PCC 7120 consiste en la sustitución mediante doble recombinación homóloga de un fragmento del cromosoma por una versión alterada, ya sea interrumpida por una casete de resistencia a antibiótico o con una delección. Los vectores que se utilizan para introducir las versiones mutadas se basan en el plásmido pCSRO (Merino-Puerto *et al.*, 2010), que deriva del plásmido pRL500 (Elhai y Wolk, 1988b).

Para la selección de clones de las estirpes mutantes de *Nostoc* sp. PCC 7120, que han incorporado el DNA transferido en la conjugación mediante doble recombinación con su genoma, se utilizaba un sistema basado en la letalidad condicional del gen *sacB* (Cai y Wolk, 1990). El gen *sacB*, presente en el plásmido cargo, determina una levansacarasa que en presencia de sacarosa genera un producto letal para numerosas bacterias, entre ellas *Nostoc* sp. PCC 7120. De este modo, los recombinantes simples, en los que el vector se ha integrado en el cromosoma como consecuencia de un único evento de recombinación, portarían el gen *sacB*, por lo que mueren en presencia de sacarosa. Por su parte, los recombinantes dobles, en los que el fragmento de DNA mutado ha sustituido al silvestre por doble recombinación, pierden la porción del vector que incluye el gen *sacB*, y por tanto son resistentes a la sacarosa.

Para seleccionar dobles recombinantes, las colonias resultantes de la conjugación, que en su mayoría corresponden a clones en los que el plásmido se ha integrado mediante recombinación simple, se sembraban por agotamiento en cajas de Petri con medio BG11* con antibióticos, que se incubaban en condiciones habituales de cultivo hasta que aparecían nuevas colonias aisladas. Este proceso se repetía 3 veces, de manera que la integración del vector mediante recombinación se homogeniza en todos los cromosomas y en todas las células de los filamentos. A continuación, se inoculaban colonias aisladas en medio BG11* líquido y se cultivaban durante una semana en condiciones estándar de cultivo, sin antibióticos en el caso en el que se esté llevando a cabo una mutación por delección, o con el antibiótico de la casete de

resistencia en el caso de mutaciones que impliquen esta estrategia. Para favorecer la segregación cromosómica de la mutación, alícuotas de 1 ml de los cultivos anteriores se sometían a un proceso de sonicación suave hasta obtener filamentos de 3-5 células. Posteriormente, se sembraban diluciones seriadas de dichas suspensiones en cajas de Petri con medio BG11* suplementado con NH_4Cl 3 mM, sacarosa 5% (p/v), y el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario. Para distinguir los dobles recombinantes de aquellos clones resistentes a sacarosa que resultan de una mutación que inactiva el gen *sacB*, se ensayaba la capacidad de crecimiento de las colonias resistentes a sacarosa en un medio suplementado con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia del plásmido cargo (que se habría perdido en los dobles recombinantes, pero no en los posibles mutantes del gen *sacB*), y se seleccionaban aquellos clones sensibles al antibiótico.

2.3. Métodos de manipulación y análisis de RNA

2.3.1. Aislamiento de RNA total de cianobacterias

Para el aislamiento de RNA total de *Nostoc* sp. PCC 7120 se utilizaba una adaptación del protocolo basado en el uso del fenol caliente descrito en (Mohamed y Jansson, 1989). Las células procedentes de cultivos de 25 ml se recogían mediante filtración por vacío a través de filtros de nitrocelulosa. Posteriormente, las células se lavaban en el mismo filtro con 10 ml de tampón $\text{T}_{50}\text{E}_{100}$ *, se resuspendían en 3 ml de este tampón, y se repartían en dos tubos de microcentrífuga, donde se centrifugaban a $16.000 \times g$ durante 2 minutos. Tras la centrifugación se descartaba el sobrenadante, y el precipitado celular se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C hasta que se realizase la extracción del RNA. Para el aislamiento de RNA total, el precipitado celular se resuspendía en 300 μl de Tampón de Resuspensión TR*, y se añadían 100 μl de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 250 mM (pH 8), y 400 μl de Tampón de Lisis TL*. Esta mezcla se transfería a un tubo de 2 ml que contenía 1 ml de fenol ácido (pH 4,5) precalentado a 65°C , se agitaba vigorosamente, y se incubaba 2,5 minutos a 65°C . El proceso de agitación e incubación se repetía dos veces. A continuación, la mezcla se centrifugaba a $16.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , y se recogía la fase acuosa, que se sometía a tres procesos de extracción. La primera de estas tres extracciones se realizaba con 1 ml de fenol ácido a 65°C , seguida de una extracción con una mezcla de 1 ml de fenol ácido:cloroformo (1:1, [v:v]) a 65°C , y de una última extracción con 1 ml de cloroformo. Para cada una de las extracciones, tras añadir la fase orgánica, la muestra se agitaba en vórtex, se centrifugaba a $16.000 \times g$ durante 2 minutos a 4°C , y se recuperaba la fase acuosa para someterla a la siguiente extracción. Tras esta serie de extracciones los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa se precipitaban añadiendo 2 volúmenes de isopropanol. Para facilitar la precipitación, los tubos se sumergían en nitrógeno líquido, tras lo cual se centrifugaban a $16.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . Los ácidos nucleicos

precipitados se lavaban con etanol al 70% (v/v) y se secaban a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de ácidos nucleicos se resuspendía en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v). En aquellos casos en los que las muestras de RNA iban a ser utilizadas para análisis de Northern blot en geles de agarosa, se eliminaba el DNA presente en la muestra mediante el uso de los reactivos del *kit Turbo DNA-free* (AmbionTM). Por último, se determinaba la concentración de RNA extraído midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001) en un espectrofotómetro *NanoDrop* modelo *ND-100*, y se analizaba su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.3.2. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de urea-poliacrilamida y transferencia a membranas de nailon

La electroforesis para fraccionar RNAs de pequeño tamaño (<1 kb) se llevaba a cabo en geles de urea-poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 19:1). Los geles se preparaban con distintos porcentajes de acrilamida total (4-8%) en función del tamaño de las moléculas a analizar en TBE* 1X, y con urea 7 M como agente desnaturalizante. A la mezcla resultante se le añadía persulfato amónico (APS) 0,08% (p/v), y N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,1% (v/v) como catalizadores de la reacción de polimerización.

Antes de cargar las muestras, el gel se sometía a una corriente eléctrica de 25 mA durante 30 minutos en TBE* 1X, y se limpiaban los pocillos con TBE* 1X para evitar que quedasen restos de urea en los mismos. Las muestras se preparaban en un volumen final de 10 µl, conteniendo 5-10 µg de RNA total y 5 µl de tampón de carga Urea Dye* 2X, se incubaban 5 minutos a 100°C, se enfriaban en hielo, y se sometían a electroforesis en TBE* 1X a 25 mA durante 1-2 horas. Para determinar el tamaño de los transcritos sometidos a análisis se empleaba el marcador de DNA comercial *2-log DNA ladder* (New England Biolabs).

Tras la electroforesis, el RNA se transfería a una membrana de nailon *Hybond N⁺* (GE Healthcare) mediante un sistema de transferencia eléctrica semiseca TE77XP (Hoefer) durante 75 minutos con un amperaje de 1,2 mA por cada cm² de gel. Para ello, sobre la base del aparato de transferencia se colocaban cuatro rectángulos de papel de filtro y dos de papel *Whatman* 3MM, recortados del tamaño del gel a transferir y previamente empapados en tampón TBE* 1X. Encima de esta capa de papeles se disponía la membrana de nailon, previamente empapada en tampón TBE* 1X, y sobre ella se colocaba el gel. Por último, sobre el gel se colocaban dos rectángulos de papel *Whatman* 3MM y cuatro de papel de filtro previamente empapados en tampón TBE* 1X. Tras la transferencia, la membrana se irradiaba 2 minutos con luz UV de 302 nm, y se dejaba secar en una estufa a 80°C durante 1-2 horas para fijar el RNA.

2.3.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturizantes de agarosa con formaldehído y transferencia a membranas de nailon

La electroforesis de RNA para fraccionar transcritos de mayor tamaño (> 1kb) se llevaba a cabo en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón MOPS* 1X con formaldehído al 2% (v/v). Las muestras se preparaban en un volumen final de 20 µl, conteniendo 10 µg de RNA total y 15 µl de tampón de carga TC_{RNA}*, se incubaban 3 minutos a 80°C, se enfriaban en hielo, y se sometían a electroforesis a 100 V durante 1-2 horas. Para determinar el tamaño de los transcritos sometidos a análisis se empleaba el marcador de RNA comercial *Riboruler High Range RNA Ladder* (Thermo Scientific). Tras la separación del RNA en la electroforesis, el gel se sometía a tres lavados de 5 minutos en agitación con abundante agua desionizada para eliminar el formaldehído, y se visualizaba con luz ultravioleta. Posteriormente, tanto el gel como la membrana de nailon a la que se va a transferir el RNA se equilibraban con tampón SSC* 10X, el tampón de transferencia, durante 10 minutos en agitación. A continuación, el RNA se transfería durante 16 horas por capilaridad (Figura 2.2) a la membrana de nailon *Hybond N⁺* (GE Healthcare). Tras la transferencia, la membrana se lavaba brevemente con tampón SSC 2X, se irradiaba 2 minutos con luz UV de 302 nm, y se dejaba secar en una estufa a 80°C durante 1-2 horas para fijar el RNA.

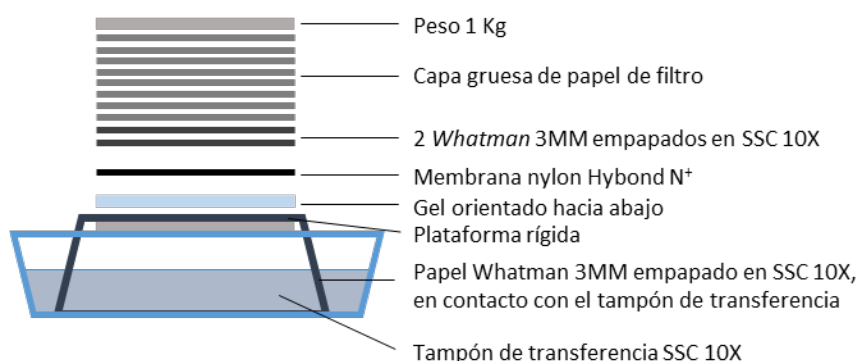


Figura 2.2. Sistema de transferencia por capilaridad de RNA en geles de agarosa a membranas de nailon. Se muestra un esquema del sistema construido para la transferencia por capilaridad. Este sistema está compuesto de un recipiente que contiene tampón de transferencia SSC* 10X. Sobre este recipiente se apoya una plataforma rígida, en la que se coloca una hoja de papel Whatman 3MM, previamente empapado en el tampón de transferencia, que permanece siempre en contacto con el tampón del recipiente. Encima de esta hoja se coloca el gel de agarosa orientado hacia abajo, y en contacto con él, evitando que queden burbujas, la membrana de nailon. Sobre la membrana se disponen dos rectángulos de papel *Whatman* 3MM del mismo tamaño que la membrana, previamente empapados en la solución de transferencia y, encima de ellos, una pila de >1 cm de altura de papel de filtro seco. Sobre esta pila se coloca un peso de aproximadamente 1 Kg. De esta manera, al ascender el tampón de transferencia por capilaridad, el RNA es arrastrado hacia arriba desde el gel hasta la membrana que está en contacto con él.

2.3.4. Detección de RNA mediante hibridación en membrana con sondas radiactivas (Northern blot)

En los análisis de Northern blot, la sonda marcada radiactivamente se generaba mediante reacciones de PCR de una hebra, en las que se amplificaba un molde de DNA usando sólo un oligonucleótido como cebador (Tabla 2.6). En estos casos, la reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 50 µl, en una mezcla de reacción que contenía 200 ng de DNA molde obtenido previamente mediante PCR; 0,2 mM de dNTPs exceptuando dCTP; 0,4 µM de un oligonucleótido complementario a la hebra que codifica el gen de estudio; 2 mM de MgCl₂; 2,5 unidades de DNA polimerasa BioTaq™ (*Bioline*) con su tampón correspondiente, y 25 µCi de [α -³²P]dCTP (3.000 Ci·mmol⁻¹). El programa de amplificación utilizado constaba típicamente de una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos de amplificación. Cada uno de estos ciclos tenía una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, una etapa de apareamiento de 40 segundos a una temperatura variable que dependía del oligonucleótido utilizado, y una etapa de extensión a 72°C durante un tiempo variable que dependía del tamaño del fragmento a amplificar. El programa terminaba con una incubación de 5 minutos a 72°C. Finalmente, el [α -³²P]dCTP no incorporado se eliminaba por filtración de la muestra en columnas de *Sephadex G-25*, y se cuantificaba la radiactividad incorporada.

Para la hibridación del RNA fijado en las membranas de nailon con sondas de DNA radiactivas, la membrana se introducía en un rodillo de vidrio con la superficie a la que está adherido el RNA hacia la zona central, y se incubaba en un horno de hibridación a 65°C durante 2 horas con 15-30 ml de solución de prehibridación*. Tras la prehibridación, se añadía la sonda de DNA marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada a 95°C durante 3 minutos, y se incubaba en el horno de hibridación a 65°C durante 12-16 horas. Posteriormente, la membrana se lavaba a 65°C durante 10 minutos dos veces con 30-50 ml de la solución de lavado 1*, y una vez con 30-50 ml de la solución de lavado 2*. Todos los procesos se llevaban a cabo con giro constante del rodillo para exponer la superficie de la membrana a las distintas soluciones.

Tanto la detección como el análisis de las señales de hibridación en las membranas se llevaban a cabo con el sistema *Cyclone Storage Phosphor System* (*Perkin Elmer*) y el programa de análisis de imágenes *Optiquant* (*Packard*).

Las sondas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 2.6. Como control de la cantidad de RNA cargada en cada calle del gel, y de la transferencia del RNA a la membrana, las membranas se hibridaban además con una sonda para el gen *rnpB*, que determina el RNA de la ribonucleasa P (un RNA de 460 nt), o con una sonda para el RNA ribosómico 5S (un RNA de 119 nt), ambos de expresión constitutiva.

Tabla 2.6. Oligonucleótidos empleados para la generación de sondas radiactivas.

#	Secuencia 5' - 3'	Descripción
125 126	TCTGGATCATACTCATAGCCG TCAAACGAAATGGCGAGATG	Sonda de 403 nt complementaria a la región de <i>nsiR3</i> (véase Figura 3.1).
158 159	CATCTGCCTCTGCCTCTTCTG CCTTCCTTGTAGGCAGTCGAG	Sonda de 639 nt complementaria a la región de <i>nsrR1</i> (véase Figura 3.13).
247 248	GTTTTATGCATTCCCTGCTAACCAGGGG GTTTTCTAGAGGAAGCTTTGAGGATTTCCGGC	Sonda de 197 nt complementaria a la región de <i>all1871</i> comprendida entre las posiciones -137 y +60.
253 254	GTTTTATGCATACAGAGGAATAATCAACAATATGGG GTTTTGCTAGCGGTGGCAAATGAGCGAATGC	Sonda de 166 nt complementaria a la región de <i>nblA</i> comprendida entre las posiciones -106 y +60.
645 646	GTTTTATGCATGTCAACAATAGAAAACACGG GTTTTTGCTAGCTTGTCTAGCAATTTCTTGAG	Sonda de 122 nt complementaria a la región de <i>putA</i> comprendida entre las posiciones -62 y +60.
649 802	GTTTTATGCATATTGCTGTGACTTTCCAGG CAACAATCCTTCTAATTTGCGACG	Sonda de 499 nt complementaria a la región de <i>alr2431</i> comprendida entre las posiciones -67 y +432 (véase Figura 3.10).
787 788	GTACTGCAAGGGGCGTGGCT CCTATTGGTAGCTTCTGCGGG	Sonda de 1.231 nt complementaria a la región de <i>nifH</i> .
5S_1 5S_2	AGTTTTCCTGGTGCCTATG TAATACGACTCACTATAGGGACCTGGCACCGAGCGATTG	Sonda de 125 nt complementaria a la región del RNA ribosómico 5S.
M13-Universal M13-Reverso	TTGTAAACGACGGCCAGTG AGCGGATAACAATTCACACAGG	Sonda de aproximadamente 500 nt complementaria a la región de <i>rnpB</i> . Se utiliza como molde el plásmido pT7-7120.

Se indica en rojo el oligonucleótido empleado en el marcaje radiactivo mediante PCR de una hebra.

2.3.5. Síntesis *in vitro* y marcaje radiactivo de RNA

Para analizar la estructura de *NsrR1* mediante sensibilidad a nucleasas, o para ensayos de protección (*footprinting*), se generaban transcritos *in vitro* con el *kit* de transcripción *MEGAscript* (*Ambion*). El molde de DNA para la transcripción de los RNAs se generaba por PCR, utilizando como pareja de cebadores un oligonucleótido que incluye la secuencia del promotor de T7 y tres Gs adicionales (para garantizar una transcripción eficiente por la polimerasa del fago de T7) aguas arriba del extremo 5' de la secuencia que codifica el RNA de interés, y un oligonucleótido complementario a la secuencia del extremo 3' del RNA (Tabla 2.5). Después de la transcripción, la reacción se trataba con DNasa I para eliminar el molde, se purificaban los RNAs mediante extracción con fenol ácido y cloroformo (apartado 2.3.1), y se precipitaban con etanol a -20°C. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaban con etanol al 70% (v/v) y se secaban a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de ácidos nucleicos se resuspendía en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v).

Para el marcaje del RNA en el extremo 5' se desfosforilaban 100 pmol del transcrito generado *in vitro* con 1 unidad de fosfatasa alcalina *rAPid alkaline phosphatase* (*Roche*) (apartado 2.2.8.2), y el RNA se purificaba y precipitaba como se ha descrito anteriormente.

Posteriormente, 20 pmol de NsrR1 desfosforilado se marcaban en el extremo 5' en una mezcla de reacción de 15 µl, conteniendo 2 µl de [γ -³²P]ATP (10 mCi/ml, 3.000 Ci/mmol) y 15 unidades de polinucleótido quinasa (*Thermo*), durante 1 hora a 37°C. Los nucleótidos no incorporados se eliminaban por filtración de la muestra en columnas de *Sephadex G-25*, y el RNA marcado se purificaba en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 10 % y urea 7 M. La posición del RNA marcado se visualizaba con el sistema *Cyclone Storage Phosphor System* (*Perkin Elmer*), y la zona del gel que contenía el RNA marcado se recortaba con un bisturí. El RNA se eluía a partir del fragmento de poliacrilamida mediante incubación durante 12-15 horas a 4°C en 300 µl de Tampón E*. El RNA se precipitaba con etanol a -20°C, se lavaba con etanol al 70%, y se resuspendía en agua.

2.3.6. Análisis de la estructura del RNA NsrR1

La estructura del RNA NsrR1 se analizó mediante el estudio de su sensibilidad a la hidrólisis por RNasa T1, RNasa A o acetato de plomo. Antes de los tratamientos, el transcrito sintetizado *in vitro* se desnaturalizaba completamente y se dejaba renaturalizar. Para ello, 0,1 pmol de NsrR1 marcado radioactivamente en su extremo 5' (apartado 2.3.5), en 7 µl de agua, se desnaturalizaba durante 1 min a 95°C, y se enfriaba en hielo durante 5 minutos. Finalmente, se añadía 1 µl de RNA de levadura 1 mg/ml (*Ambion*), 1 µl de tampón de estructura 10X (*Ambion*), y se incubaba durante 15 minutos a 37°C.

Para el tratamiento con RNasa, se añadía al RNA renaturalizado 1 µl de RNasa T1 a 0,01 U/ml (*Ambion*) o 1 µl de RNasa A a 0,01 U/ml, y las muestras se incubaban durante 5, 10 ó 15 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detenían añadiendo 20 µl de tampón de Inactivación/Precipitación (*Ambion*) e incubando las muestras a -20°C durante 15 minutos. El precipitado se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 3-7 µl de tampón de carga desnaturalizante con formamida (*Ambion*).

Para el tratamiento con acetato de plomo se añadía 1 µl de acetato de plomo (II) 25 mM (*Sigma Aldrich*) recién preparado, y las muestras se incubaban durante 1 minuto a 37°C. Las reacciones se detenían añadiendo 1 µl de 0,1 M EDTA y 22 µl de tampón de Inactivación/Precipitación (*Ambion*), e incubando las muestras a -20°C durante 15 minutos. También en este caso, el precipitado se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 3-7 µl de tampón de carga desnaturalizante con formamida (*Ambion*).

Como marcadores de tamaño se utilizaba una escalera generada mediante hidrólisis alcalina del RNA marcado, y una escalera de todos los fragmentos que terminan en G, generada mediante hidrólisis por RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes. La escalera alcalina se obtenía incubando 0,2 pmol de NsrR1 marcado, con 7,5 µl de tampón de hidrólisis alcalina

Materiales y Métodos

(*Ambion*) conteniendo 1,5 µg de RNA de levadura (*Ambion*), a 95°C durante 3 minutos. La reacción se detenía añadiendo 15 µl de tampón de carga desnaturizante con formamida (*Ambion*). La escalera con RNasa T1 se obtenía incubando 0,1 pmol de NsrR1 marcado, con 1 µl de RNA de levadura 1 mg/ml (*Ambion*) en 9 µl de tampón de Secuenciación (*Ambion*), durante 10 minutos a 50°C. Tras la incubación, se añadía 1 µl de RNasa T1 a 0,1 U/ml (*Ambion*), y las muestras se incubaban a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las reacciones se detenían añadiendo 20 µl de tampón de Inactivación/Precipitación (*Ambion*) e incubando las muestras a -20°C durante 15 minutos. El precipitado se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 3-7 µl de tampón de carga desnaturizante con formamida (*Ambion*).

Todas las muestras se analizaban en geles desnaturizantes de poliacrilamida 10 % y urea 7 M de 0,2 mm de grosor. La radioactividad se visualizaba mediante el sistema *Cyclone Storage Phosphor System* (*Perkin Elmer*).

2.3.7. Análisis de la interacción de NsrR1 y las regiones 5'UTR de los mRNAs de *nblA* y *all1871*

El análisis de la interacción de NsrR1 con las regiones 5'UTR de los mRNAs de *nblA* y *all1871* se llevó a cabo determinando las posiciones de NsrR1 protegidas de la hidrólisis por RNasa T1, RNasa A y acetato de plomo tal como se indica en el apartado anterior. Además, estos análisis se realizan en presencia de diferentes cantidades de un fragmento de RNA correspondiente a la región 5'UTR de los mRNAs de *nblA* o *all1871*, que se mezclaban con el RNA NsrR1 marcado (apartado 2.3.5) antes de iniciar su desnaturización seguida de renaturalización, tal y como se describe en el apartado anterior.

2.4. Métodos de manipulación y análisis de proteínas

2.4.1. Preparación de extractos celulares cianobacterianos

Células procedentes de cultivos de 25 ml se recogían mediante filtración por vacío a través de filtros de nitrocelulosa. Posteriormente, las células se lavaban en el mismo filtro con 10 ml de tampón T₅₀E₁₀₀*, se resuspendían en 3 ml de este tampón, y se repartían en dos tubos de microcentrifuga, donde se centrifugaban a 16.000 x *g* durante 2 minutos. El precipitado celular, conteniendo 20-50 µg de clorofila, se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C hasta que se realizase la extracción.

Para la preparación de extractos celulares, se añadía al precipitado de células una cantidad equivalente a 75 µl de perlas de vidrio (0,25-0,3 mm de diámetro), y 500 µl de Tampón de Extracción*. La mezcla se sometía a 7 ciclos de agitación con vórtex (1 minuto) e incubación en hielo (1 minuto), y se centrifugaba a 1.500 x *g* durante 1 minuto a 4°C.

Se recuperaba el sobrenadante descartando las perlas de vidrio, y se centrifugaba a $3.000 \times g$ durante 3 minutos a 4°C . El sobrenadante obtenido tras esta centrifugación corresponde al extracto total (fracción soluble + fracción de membrana). La mitad de este sobrenadante se guardaba a -20°C como extracto total, mientras que la otra mitad se centrifugaba a $16.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . El sobrenadante de esta centrifugación constituye la fracción soluble, y el precipitado la fracción de membrana. Ambas se conservaban a -20°C hasta su uso.

2.4.2. Métodos de cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas solubles se empleaba el método de Bradford (Bradford, 1976). A cada muestra, en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ en agua, se le añadían $800 \mu\text{l}$ de reactivo de Bradford comercial (*Bio-Rad*) diluido previamente en agua (1:4, [v/v]). Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se medía la absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas de cada muestra, paralelamente se elaboraba una curva patrón con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

Para determinar la cantidad de proteína en células enteras o en extractos que contenían membranas se empleaba un método modificado del protocolo de Lowry (Markwell *et al.*, 1978). A cada muestra, en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ en agua, se le añadían $50 \mu\text{l}$ de NaOH 0,5 N y $750 \mu\text{l}$ de una disolución obtenida tras mezclar en proporción 100:1 las soluciones A* y B*. La mezcla se agitaba brevemente con vórtex y se incubaba 5 minutos a 37°C . Posteriormente, se añadían $75 \mu\text{l}$ del reactivo de Folin-Ciocalteu (*Merck*) diluido 1:1 en agua, y las muestras se incubaban de nuevo 5 minutos a 37°C . Finalmente, se medía la absorbancia a 750 nm. Para determinar la concentración de proteínas de cada muestra, paralelamente se elaboraba una curva patrón con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

2.4.3. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación analítica de proteínas se llevaba a cabo mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970) descrito en (Sambrook y Russell, 2001).

El gel de separación se preparaba en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) a una concentración de poliacrilamida del 10-17%, mientras que el gel de empaquetamiento se preparaba en tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) a una concentración de poliacrilamida del 5%. Ambos geles contenían SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico (APS) 0,05% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,1% (v/v) como catalizadores de la reacción de polimerización.

Materiales y Métodos

Las muestras de proteínas se preparaban en un volumen máximo de 30 µl en el que una cuarta parte correspondía al tampón de carga TC_{prot}* 4X. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se desnaturalizaban a 100°C durante 3 minutos. Como patrón de tamaño se utilizaba el marcador de peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). La electroforesis se realizaba en aparatos *Miniprotean II* (Bio-Rad) con tampón Running*, aplicando un voltaje constante de 200 V durante 45-60 minutos.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se visualizaban mediante la fijación y tinción de los geles en una disolución de azul de Coomassie R-250* (*Sigma Aldrich*), que se agitaba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles se lavaban con agitación a temperatura ambiente varias veces con una solución de desteñido*, visualizándose las proteínas como bandas de color azul.

2.4.4. Expresión en *E. coli* y purificación de las proteínas All1871 y NblA recombinantes para la producción de anticuerpos

2.4.4.1. Expresión de las proteínas All1871 y NblA recombinantes y preparación del extracto

Para la sobreexpresión de las proteínas All1871 y NblA recombinantes se utilizó la estirpe de *E. coli* BL21-(DE3)-RIL (Tabla 2.2), estirpe en la que el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7 está bajo el control de un promotor regulado por IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido). Esta estirpe se transformó por electroporación (apartado 2.2.9.2) con los plásmidos pIAE30 o pIAE32 (Tabla 2.4). El plásmido pIAE30 contiene la región codificante de All1871 en el vector pET-28a(+), de manera que el transcrito se produce desde un promotor dependiente de la RNA polimerasa del fago T7, y la proteína se traduce en fase con una etiqueta de seis histidinas en el extremo C-terminal. Por su parte, el plásmido pIAE32 contiene la región codificante de NblA en el vector pET-28a(+), de modo que el transcrito se produce desde un promotor dependiente de la RNA polimerasa del fago T7, y la proteína se traduce en fase con una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal.

Se partía de un cultivo estacionario de células de *E. coli* conteniendo los plásmidos pIAE30 o pIAE32 en medio LB* suplementado con 30 µg·ml⁻¹ de cloranfenicol (Cm), 50 µg·ml⁻¹ de kanamicina (Km) y glucosa 1% (p/v), tras crecer en agitación a 37°C durante 10-12 horas. Un volumen de 150 ml procedente del cultivo anterior se reinoculaba en 1,5 litros de LB* suplementado con 30 µg·ml⁻¹ de cloranfenicol (Cm) y 50 µg·ml⁻¹ de kanamicina (Km), incubándose a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzaba una densidad óptica de 0,6 a

600 nm. Entonces, se añadía al cultivo IPTG a una concentración final de 1 mM, y se continuaba la incubación en las mismas condiciones durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, las células se recogían por centrifugación a $6.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , el precipitado se lavaba con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8), y se procesaba inmediatamente, o se guardaba a -20°C .

Para la obtención del extracto libre de células, el precipitado se resuspendía a razón de $5 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco en el tampón en el que se iba a iniciar la cromatografía. El tampón de inicio de la cromatografía, tampón A*, conteniendo además Imidazol 5 mM en el caso de All1871, o 40 mM en el caso de NblA, se suplementaba con PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, y en el caso de All1871, que es una proteína no soluble cuando se expresa en *E. coli*, se añadía además urea 6 M para solubilizar la proteína.

La suspensión celular se sometía a rotura por sonicación en un sonicador *MicroPulser*TM (*BioRad*) con un 30% de amplitud durante 2,5 minutos, repartidos en 5 pulsos de 30 segundos con intervalos de descanso de 40 segundos entre cada pulso. Posteriormente, la muestra se centrifugaba a $16.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C , y el sobrenadante se separaba rápidamente a un tubo nuevo sin perturbar el precipitado. Este sobrenadante constituye la fracción soluble que se utilizará para la purificación de las proteínas recombinantes.

2.4.4.2. Purificación de las proteínas All1871 y NblA recombinantes

Las proteínas All1871 y NblA se purificaron a partir de la fracción soluble del extracto correspondiente mediante cromatografía. En primer lugar, se realizó una cromatografía de afinidad utilizando las etiquetas de poli-histidina como elemento de afinidad al níquel. Para este propósito, se utilizaron columnas HisTrap HP de 1 ml (*GE Healthcare*) en un sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) *ÄKTA purifier*. Dado que la proteína All1871 resultó no ser soluble al sobreexpresarla en *E. coli*, los tampones usados para la cromatografía de esta proteína estaban suplementados con urea 6 M. El método utilizado para la cromatografía consistía en el equilibrado de la columna a un flujo de 1 ml/min con 5 ml de tampón A*, seguido de la inyección de la muestra, y del lavado de la columna a un flujo de 1 ml/min con 5 ml del mismo tampón de equilibrado. La elución de las proteínas se realizaba mediante un gradiente de Imidazol de 5 mM a 500 mM en el caso de All1871, o de 40 mM a 500 mM en el caso de NblA. Para ello, se pasaban por la columna 10 ml de una mezcla de los tampones A* y B* con concentraciones crecientes de B*. Durante la elución se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las proteínas presentes en las diferentes fracciones se visualizaban mediante electroforesis desnaturalizante en geles de SDS-poliacrilamida (apartado 2.4.3) (Figura 2.3).

Materiales y Métodos

A continuación, se realizó un segundo paso de purificación mediante cromatografía de filtración en gel. Para ello, las fracciones 58-70 de All1871, y 30-44 de NblA (Figura 2.3), resultado de la elución de la columna His-Trap, se combinaron y se concentraron en un volumen final de 2 ml mediante centrifugación a 4.000 *g* en *Amicon Ultra-4, Ultracel-3, 3 kDa* (Merck). Las fracciones concentradas se inyectaron en una columna Hi-Load 16/60 Superdex 75 de 120 ml (*Pharmacia Biotech*) en un sistema de FPLC *ÄKTA purifier*. Los tampones usados para la filtración en gel de la proteína All1871 estaban suplementados con urea 2 M. El método utilizado consistía en el equilibrado de la columna a un flujo de 0,5 ml/min con 240 ml de tampón F*, seguido de la inyección de la muestra. Durante la elución se recogieron fracciones de 1,5 ml. Las proteínas presentes en las diferentes fracciones se visualizaban mediante electroforesis desnaturalizante en geles de SDS-poliacrilamida (apartado 2.4.3) (Figura 2.3). Las fracciones 44-50 de All1871, y 43-53 de NblA, resultado de la elución de la columna Hi-Load 16/60 Superdex 75, se combinaron y se concentraron en un volumen final de 2 ml mediante centrifugación a 4.000 *x g* en *Amicon Ultra-4, Ultracel-3, 3 kDa* (Merck). Las fracciones concentradas se guardaron a -20°C, y en el caso de NblA se añadió glicerol al 10% a la mezcla antes de congelarla.

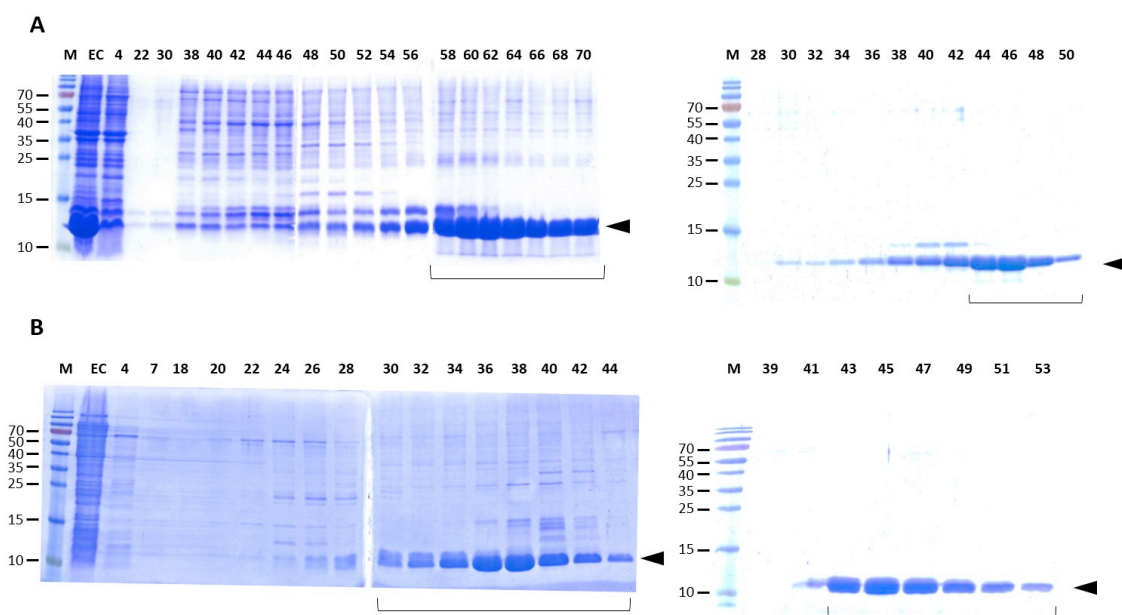


Figura 2.3. Purificación de las proteínas All1871 (A) y NblA (B) recombinantes mediante cromatografía de afinidad por níquel (paneles de la izquierda) seguida de cromatografía de filtración en gel (paneles de la derecha). Geles de SDS-poliacrilamida al 15% (All1871) o al 17% (NblA) con 5 μ l de algunas de las fracciones obtenidas mediante los distintos procesos de cromatografía. El significado de las abreviaturas utilizado en la parte superior de los paneles es el siguiente: EC, fracción soluble del extracto crudo libre de células; M, patrones de tamaño *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); los números indican la fracción del gradiente analizada. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kDa). Se señalan con un triángulo negro las proteínas All1871 (A) o NblA (B) recombinantes, y con una barra negra las fracciones que se combinaron en cada caso.

2.4.5. Producción y purificación de anticuerpos frente a las proteínas All1871 y NblA

Para la producción de los anticuerpos frente a las proteínas All1871 y NblA, se inyectaron en cada caso a sendos conejos un total de 3,5 mg de la proteína recombinante purificada correspondiente (apartado 2.4.4.2) mediante 7 inyecciones subcutáneas en el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Se obtuvieron sueros varias veces hasta 5 meses después de la primera inyección, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Los anticuerpos específicos frente a All1871 y NblA se purificaron a partir del suero de los conejos inmunizados mediante cromatografía de afinidad utilizando el *kit AminoLink^R Plus Immobilization Kit (Thermo Fisher)*. Este sistema está basado en la inmovilización de la proteína purificada, utilizada como antígeno, mediante la unión covalente de sus grupos amino primarios a los grupos aldehído que contiene la resina de agarosa proporcionada en el *kit* tras una reducción con cianoborohidruro de sodio. Las columnas para la purificación de ambos anticuerpos se prepararon con 2,5 mg de la proteína All1871 purificada, o con 5 mg de la proteína NblA purificada. En ambos casos, se aplicaron 3 ml de suero sobre la columna, se lavó con el tampón de lavado incluido en el *kit*, y los anticuerpos unidos se eluyeron con el tampón de elución, también suministrado en el *kit*, recogiendo por gravedad fracciones de 250 µl. Las fracciones que contenían anticuerpo se identificaron mediante análisis de Western blot (apartado 2.4.6), se combinaron, y guardaron a -20°C hasta su uso.

2.4.6. Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y detección inmunológica (Western blot)

Para la detección de proteínas con anticuerpos, tras la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (apartado 2.4.3), las proteínas del gel se transferían a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro, incluidas en el *kit* de transferencia *Trans-Blot[®] Turbo[™] RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad)*, mediante el sistema de transferencia *Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (Bio-Rad)*. Habitualmente, la transferencia se llevaba a cabo siguiendo el protocolo *Mixed MW*, predefinido en el aparato de transferencia, a una intensidad de corriente continua de 1,3 A durante 7 minutos.

Tras la transferencia, la membrana se incubaba en solución de bloqueo* durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación orbital. Posteriormente, la membrana se incubaba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo* nueva a razón 1:10.000 para el anticuerpo frente a GFP (*Roche*), 1:50.000 para el anticuerpo frente a GroEL de *E. coli* (*Sigma Aldrich*), 1:500 para el anticuerpo frente a NblA, y 1:10.000 para el anticuerpo frente a All1871,

durante 15 horas a 4°C con agitación orbital. El anticuerpo frente a GroEL de *E. coli* detecta también a la proteína GroEL de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Jager y Bergman, 1991). Tras ello, la membrana se lavaba 3 veces durante 10 minutos con tampón PBS* suplementado con 0,1% Tween-20, y una vez durante 10 minutos con tampón PBS*. Una vez lavada, la membrana se incubaba con agitación orbital durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo* a razón 1:20.000 para el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate (*Sigma Aldrich*), utilizado en los casos en los que el anticuerpo primario usado había sido el anticuerpo frente a GroEL, NblA o All1871 o a razón 1:3.000 para el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (*Bio-Rad*), en los casos en los que el anticuerpo primario usado había sido el anticuerpo frente a GFP. Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, la membrana se lavaba 3 veces durante 10 minutos con tampón PBS* suplementado con 0,1% Tween-20, y una vez durante 10 minutos con tampón PBS.

Finalmente, para el proceso de revelado de la membrana se empleaba el juego de reactivos comercial *ECL-Plus* (*Amersham*). La visualización de la señal se llevaba a cabo exponiendo la membrana en un aparato de captación de imágenes, *ChemiDoc™ Imaging System* (*BioRad*), durante un tiempo variable entre 1-15 minutos. El tratamiento de las imágenes se realizaba con el *software Image Lab* (*BioRad*).

2.4.7. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para el análisis de la interacción de la proteína NtcA con fragmentos de DNA, se llevaron a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética con la proteína NtcA recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 purificada. Los fragmentos de DNA usados se obtenían mediante PCR y se marcaban en los extremos 5' con [γ -³²P]ATP.

El marcaje de los fragmentos de DNA se realizaba con 15 U de T4 polinucleótido quinasa (*Fermentas*) en un volumen final de 15 μ l, en una mezcla de reacción conteniendo 100 fmol de fragmento de DNA en un volumen de 2,5 μ l, 1,5 μ l de buffer A proporcionado con la enzima, 2 μ l de [γ -³²P]ATP conteniendo 6,6 pmol, 1,5 μ l de polinucleótido quinasa del fago T4, y 7,5 μ l de agua. La mezcla se incubaba a 37°C durante 30-45 minutos, y el [γ -³²P]ATP no incorporado se eliminaba por filtración de la muestra en columnas de *Sephadex G-25*. Por último, la eficiencia del marcaje se estimaba cuantificando 1 μ l de la muestra radiactiva obtenida en un contador de centelleo *Beckman LS 2800*.

La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 15 μl , 6 μl de tampón de unión* 2,5X, 2 μl de poly(dI-dC) conteniendo 10 U $A_{260}/500 \mu\text{l}$, 1 μl de seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 μl de 1,4-ditiotreitol (DTT) 15 mM, 1 μl de 2-oxoglutarato 9 mM, 1 μl de DNA marcado correspondiente a 5.000 cpm, y una cantidad variable de proteína NtcA recombinante purificada en un volumen final de 3 μl de tampón P*. Tras incubar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente, se añadía 1,5 μl de tampón de unión* 2,5X, y se analizaba mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes en un gel de acrilamida al 6% (p/v) (acrilamida:bis-acrilamida, 30:0,36) preparado en tampón TBE* 0,25X con glicerol 10% (v/v). Antes de cargar las muestras, los geles se sometían a una corriente eléctrica de 100 V durante 30 minutos a 4°C, y se limpiaban los pocillos con TBE* 0,25X. Finalmente, se cargaban las muestras directamente, y se sometían a electroforesis en TBE* 0,25X a 200 V durante 1-2 horas, dependiendo del tamaño del fragmento de DNA utilizado. La detección de la posición de los fragmentos de DNA en el gel se llevaba a cabo con el sistema *Cyclone Storage Phosphor System (Perkin Elmer)* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant (Packard)*.

2.5. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

2.5.1. Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila *a* de las suspensiones celulares se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Las células de 1 ml de cultivo se recogían por centrifugación, y tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendía en 1 ml de metanol y se agitaba con vórtex durante 1 minuto. La suspensión resultante se centrifugaba a 16.000 $\times g$ durante 2 minutos. La concentración de clorofila en el sobrenadante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon=74,46 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.5.2. Espectros de absorción de células enteras de *Nostoc* sp. PCC 7120

Para la realización de espectros de absorción de células enteras se medía la absorbancia entre 500 y 750 nm de 0,5 ml de cultivo mezclados con 0,5 ml de glicerol 50% en un espectrofotómetro *JASCO V-650*. Los espectros se normalizaban por el contenido de clorofila a 680 nm después de restar la absorbancia a 750 nm. Los valores de absorbancia a 635 nm y 680 nm se usaron para estimar el contenido de ficocianina y clorofila respectivamente.

2.6. Ensayos para la validación *in vivo* de la interacción entre un sRNA y los mRNAs diana

Para verificar la interacción entre un sRNA y cualquiera de sus posibles mRNAs diana se utilizó un sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli* (Urban y Vogel, 2007), basado en la coexpresión constitutiva del sRNA y el mRNA diana (Figura 2.4). Para ello se utilizaban dos plásmidos compatibles, un plásmido de alto número de copias (derivado de pZE12-luc) en el que se clonaba el gen que codifica el sRNA a estudiar, y un plásmido de bajo número de copias (derivado de pXG-10-SF o pXG-30-SF) en el que se clonaba una fusión de la región 5'UTR y los primeros aminoácidos de la zona codificante del mRNA en cuestión con el gen de la variante “*superfolder*” de la proteína verde fluorescente (*sfgfp*) (Corcoran *et al.*, 2012). Se ha demostrado que esta variante de la proteína GFP proporciona señales más intensas, así como una mejor diferencia entre la autofluorescencia de las células de *E. coli* y la fluorescencia derivada de la expresión de la fusión que contiene el gen *sfgfp*, generando de este modo unos datos más fiables (Corcoran *et al.*, 2012). La interacción del sRNA con el mRNA diana se evaluaba a partir de los cambios en la fluorescencia GFP que se observaban cuando se comparaban los niveles de fluorescencia de cultivos que portaban diferentes combinaciones de los plásmidos desde los que se transcriben el sRNA y el mRNA diana.

Los genes que codifican NsrR1 o NsiR3 se amplificaron por PCR, y se clonaron en pZE12-luc según se recoge en (Urban y Vogel, 2007). Para ello, se utilizaron como cebadores un oligonucleótido 5'-fosforilado correspondiente al inicio de la secuencia que codifica el sRNA, y un oligonucleótido, que introduce un sitio XbaI, complementario a una secuencia situada 50 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' de la secuencia que codifica el sRNA.

Si el mRNA correspondía a un gen monocistrónico o al primer gen de un operón del que se conoce su promotor se utilizaba el plásmido pXG-10-SF, mientras que si la secuencia a analizar correspondía al interior de una región de un mRNA policistrónico se utilizaba el plásmido pXG-30-SF (Urban y Vogel, 2007). En el primero de estos casos, la región del mRNA utilizada para la fusión con el gen *sfgfp* se extiende desde el TSS (Mitschke *et al.*, 2011b) hasta los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante del mRNA. Para la generación de dicha fusión, la secuencia del mRNA se amplificaba con una pareja de cebadores externos que agregan un sitio de restricción NsiI justo delante del TSS, y un sitio de restricción NheI justo detrás del nucleótido 60 de la región codificante del mRNA. Posteriormente, este fragmento se clonaba de forma dirigida en el plásmido pXG-10-SF, que porta el gen *sfgfp* justo detrás del sitio de restricción NheI, generándose de este modo la fusión del mRNA con el gen *sfgfp* (Figura 2.4) (Urban y Vogel, 2007).

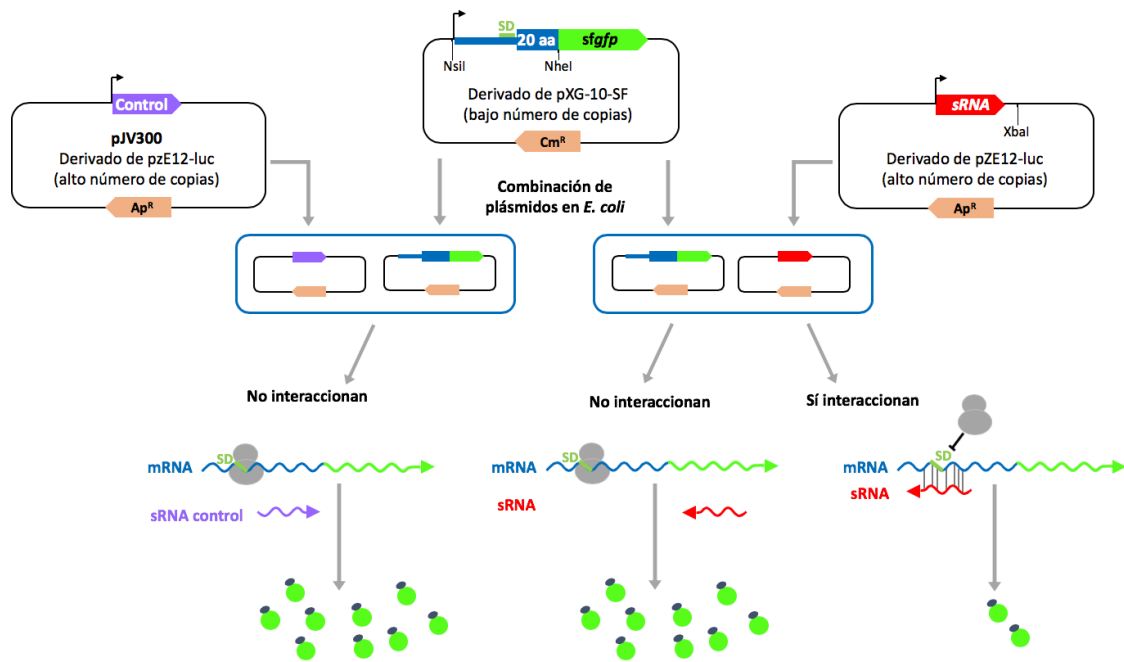


Figura 2.4. Esquema del sistema heterólogo implementado en *E. coli* utilizado para la validación *in vivo* de la interacción entre un sRNA y sus mRNAs diana. Se representa un ejemplo concreto en el que el mRNA diana corresponde a un gen monocistrónico o al primer gen de un operón del que se conoce su promotor. En estos casos, la región del mRNA utilizada para la fusión con el gen *sfGFP* se extiende desde el TSS (flecha negra) hasta los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante del mRNA (azul). Este fragmento se clona de forma dirigida en el plásmido pXG-10-SF. La clonación del gen que codifica el sRNA (rojo) en el plásmido pZE12-luc se representa arriba a la derecha. Se señalan los sitios de restricción más relevantes para dichas clonaciones. Arriba a la izquierda se representa el plásmido pJV300, que expresa un sRNA control (violeta) (Tabla 2.3). Tras la combinación de los plásmidos en *E. coli*, se muestran las diferentes posibilidades que pueden tener lugar tras la expresión de los transcritos del mRNA diana y el sRNA. (Izquierda) El mRNA diana no interacciona con el sRNA control, observándose los niveles de fluorescencia GFP (círculos verdes y azules) propios del mRNA diana. (Centro) Si no hay interacción entre el sRNA y el mRNA diana, los niveles de fluorescencia GFP permanecen similares a los del control. (Derecha) Si ambos transcritos interaccionan, los niveles de fluorescencia GFP se ven alterados con respecto al control, reducidos en este ejemplo concreto, en el que la interacción tiene lugar en la región Shine-Dalgarno (SD) del mRNA, impidiendo la unión del ribosoma (gris) e inhibiendo la traducción.

En las ocasiones en los que la secuencia a analizar correspondía al interior de una región de un mRNA policistrónico, la clonación del mRNA para generar la fusión con el gen *sfGFP* se llevaba a cabo en el vector para la fusión de operones pXG-30-SF. En estos casos, la secuencia del mRNA se amplificaba desde una posición situada 60 nucleótidos dentro del gen anterior. El procedimiento para la amplificación de la secuencia del mRNA es similar al descrito para el caso de genes monocistrónicos. Así, la secuencia del mRNA se amplificaba con una pareja de cebadores externos, que agregan un sitio de restricción NsiI justo delante del primer nucleótido de la región del mRNA seleccionada para la clonación, y un sitio de restricción NheI justo detrás del nucleótido 60 de la región codificante del mRNA. Posteriormente, este fragmento se clonaba de forma dirigida en el plásmido pXG-30-SF, que porta un epítipo FLAG con el gen *lacZ* truncado justo delante del sitio de restricción NsiI, y el gen *sfGFP* justo detrás del sitio de restricción NheI (Urban y Vogel, 2007). De este modo, se genera una fusión C-terminal que

Materiales y Métodos

permite simular la composición de un operón. Dicha fusión está compuesta de un marco de lectura artificial corto (formado por el epítipo FLAG con el gen *lacZ* truncado), de la región del mRNA clonada, y del gen *sfgfp* (Figura 2.5).

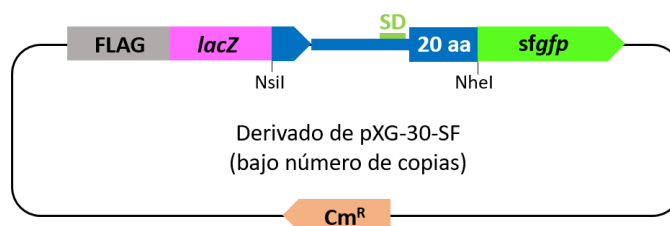


Figura 2.5. Representación esquemática de la construcción de un plásmido derivado de pXG-30 para la validación *in vivo* de la interacción entre un sRNA y una secuencia correspondiente al interior de una región de un mRNA policistrónico. En estos casos, la región del mRNA utilizada para la fusión con el gen *sfgfp* se extiende desde una posición en fase con la región C-terminal del marco abierto de lectura situado aguas arriba del gen de interés, hasta los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante del mRNA (azul). Este fragmento se clona de forma dirigida en el plásmido pXG-30-SF. Se señalan los sitios de restricción más relevantes. El epítipo FLAG y el gen *lacZ* truncado se representan en gris y rosa respectivamente.

Una vez que se habían clonado los genes que codifican el sRNA y el mRNA a estudiar en los plásmidos correspondientes, éstos se cotransformaban en la estirpe DH5 α de *E. coli* mediante choque térmico (apartado 2.2.9.1). La fluorescencia de los diferentes cultivos se determinó mediante citometría de flujo, fluorimetría, o en placas con medio sólido LB* (Urban y Vogel, 2007). Las medidas de fluorescencia mediante citometría de flujo se llevaban a cabo en el citómetro de flujo *BD Influx* disponible en el Servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Las muestras se preparaban diluyendo 15 μ l de cultivo líquido en estado estacionario en 3 ml de PBS*, y las medidas se realizaban a una longitud de onda de excitación de 488 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Para la interpretación de los resultados se utiliza el *software BD FACSTM 1.0.0.650*. Por su parte, las medidas mediante fluorimetría se llevaban a cabo en un lector de microplacas *Varioskan LUX Multimode Microplate Reader* (Thermo Fisher). Las muestras se preparaban recogiendo por centrifugación 0,5 ml de cultivo líquido en estado estacionario. A continuación, se eliminaba todo el sobrenadante, se resuspendían las células en 1 ml de PBS, y se cargaban 200 μ l de la suspensión resultante en cada pocillo de la microplaca. Las medidas de fluorescencia se realizaban a una longitud de onda de excitación de 488 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Además, se medía la absorbancia de cada muestra a 600 nm para normalizar los valores de fluorescencia obtenidos en función de la densidad celular. Por último, en los casos en los que se analizó la fluorescencia en medio sólido LB, las placas se escanearon con el detector de fluorescencia *FLA-5000 Imaging System* (Fujifilm).

2.7. Ensayo de la actividad nitrogenasa

Para la determinación de la actividad nitrogenasa en células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc::all1871}* (Tabla 2.1) se utilizó el método de reducción de acetileno descrito en (Stewart *et al.*, 1967). Este método se basa en la estimación de la actividad nitrogenasa mediante la determinación de la tasa de producción de etileno a partir de acetileno. El ensayo se llevaba a cabo tanto en condiciones óxicas como anóxicas.

En ambos casos, cultivos celulares establecidos en amonio se sometían a condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado durante 20-24 horas. Para favorecer el crecimiento de las células el medio en cuestión se suplementaba con NaHCO₃ a una concentración final de 10 mM. Tras la incubación en condiciones de limitación de nitrógeno se transferían 2 ml de cada suspensión celular, a una concentración de 5 µg·ml⁻¹ de clorofila, a dos matraces Erlenmeyer de 17 ml de capacidad, uno para realizar el experimento en condiciones óxicas, y otro para realizarlo en condiciones anóxicas.

Para realizar el ensayo en condiciones óxicas los matraces se cerraban herméticamente con un tapón de goma y se agitaban en las mismas condiciones de cultivo durante 30 minutos. Por su parte, para realizar el ensayo en condiciones anóxicas, a los matraces se les añadían 5 µl de DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetillurea) a una concentración final de 10 mM, se cerraban herméticamente con un tapón de goma, y se les sustituía toda la fase gaseosa por argón. Posteriormente, se agitaban en las mismas condiciones de cultivo durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo de incubación en cada caso, se inyectaban 2 ml de acetileno a cada matraz, resultando una atmósfera con un 13,3% (v/v) de acetileno en aire. A continuación, se tomaban muestras de 1 ml de la fase gaseosa cada 15 minutos, entre los 0 y los 90 minutos de incubación en presencia de acetileno, y se determinaba mediante cromatografía de gases la aparición de etileno en la fase gaseosa. Las medidas de etileno mediante cromatografía de gases se llevaron a cabo en el cromatógrafo de gases GC-2010 (*Shimadzu*) disponible en el Servicio de Cromatografía del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Finalmente, para normalizar la concentración de etileno producido se determinaba la concentración de clorofila de cada cultivo (apartado 2.5.1). Para el análisis de los datos se representaba la concentración de etileno/concentración de clorofila frente al tiempo. La pendiente de la recta corresponde a la actividad nitrogenasa de cada muestra en µmol de etileno producido·h⁻¹·mg·Chl⁻¹.

2.8. Microscopía confocal láser para la detección de la proteína GFP en *Nostoc* sp. PCC 7120

La acumulación de la proteína testigo GFP en células de *Nostoc* sp. PCC 7120 se analizaba mediante microscopía confocal láser. Para ello, en este trabajo se ha utilizado la proteína GFPmut2, una versión modificada de la proteína verde fluorescente (GFP) (Cormack *et al.*, 1996). Las muestras se visualizaban con un objetivo de inmersión en aceite HCX PLAN-APO 63x 1.4 NA, en un microscopio confocal láser *Leica TCS SP2*. La proteína GFP se excitaba con una longitud de onda de 488 nm proporcionada por un láser de argón, y la fluorescencia emitida se monitorizaba en el rango de 500-538 nm (GFP), y en el rango de 630-700 nm para la fluorescencia inherente a los pigmentos cianobacterianos (autofluorescencia). Las muestras analizadas se disponían en medio sólido con el objetivo de visualizar todos los filamentos en el mismo plano.

Los niveles de fluorescencia de la proteína GFP y de autofluorescencia fueron cuantificados mediante el tratamiento de las imágenes de microscopía confocal con el programa *Leica Confocal Software*.

2.9. Tinción de proheterocistos y heterocistos con azul Alcian

El azul Alcian (*Alcian Blue 8GX, Sigma Aldrich*) tiñe los polisacáridos de la envuelta de los proheterocistos y heterocistos (McKinney, 1953). Para visualizarlos en el microscopio óptico, la muestra se preparaba mezclando en proporción 5:1 (v/v) la suspensión de las cianobacterias y una disolución de azul Alcian al 1% en (p/v) agua.

2.10. Análisis bioinformático de secuencias de DNA y proteínas

Para el manejo rutinario de secuencias de DNA, incluyendo la búsqueda de pautas abiertas de lectura, localización de dianas de restricción, o traducción de secuencias nucleotídicas, se utilizaba el programa ApE (*A plasmid Editor*) diseñado por M. Wayne Davis, y disponible en (<http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ap/>).

La secuencia del genoma completo de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001), disponible en la base de datos Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.org.jp/cyanobase/>), se utilizó para consultar secuencias de pautas abiertas de lectura y sus correspondientes contextos genómicos.

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó la herramienta *Oligo Calculator* (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>), del *Web Toolbox* de *Sigma*.

Las secuencias de los sRNAs estudiados en este trabajo, así como sus secuencias homólogas, se obtuvieron de (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). Para la predicción de la estructura secundaria de los sRNAs se utilizó Mfold (Zuker, 2003), disponible en (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>).

Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas se empleó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), proporcionada por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), así como el *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), diseñado por Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, y Sudhir Kumar, y disponible en (<https://www.megasoftware.net/>). Este *software* usa el programa CLUSTALW2 (Chenna *et al.*, 2003), proporcionado por el *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI).

Para la identificación de posibles mRNAs regulados por los sRNAs de estudio, en este trabajo se empleó el algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014). Las predicciones de las posibles interacciones entre estos sRNAs y sus posibles mRNAs diana se llevaron a cabo con el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). Ambas herramientas se encuentran disponibles en la plataforma web RNA Tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>) de la Universidad de Freiburg (Alemania).

RECETARIO

RECETARIO

MEDIOS DE CULTIVO

- **BG11:** Na₂CO₃ 0,2 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,24 mM, K₂HPO₄ 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM, citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg/ml, Na₂-EDTA 2,4 μM, H₃BO₃ 46 μM, MnCl₂ 9,1 μM, Na₂MoO₄ 1,6 μM, ZnSO₄ 0,8 μM, CuSO₄ 0,3μM y CoCl₂ 0,2 μM. [**EDTA**, Ácido etilendiaminotetraacético].
- **BG11-Cu²⁺:** Idéntico a BG11 pero sin incluir CuSO₄ 0,3μM.
- **LB:** NaCl 10 g/L, bactotripton 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L.

ASLAMIENTO DE DNA

- **T_{1/10}E:** Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM (pH 8). [**Tris**, Tris-(hidroximetil)aminoetano].

ELECTROFORESIS DE DNA

- **Tampón de carga DNA 5X:** Glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25% y xilenecianol FF 0,25%.
- **TBE 1X:** Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM (pH 8).

ASLAMIENTO DE RNA

- **T₅₀E₁₀₀:** Tris-HCl 50 mM y EDTA 100 mM (pH 8).
- **TL:** SDS 2% y acetato sódico 10 mM (pH 4,5). [**SDS**, Dodecil sulfato sódico].
- **TR:** Sacarosa 300 mM y acetato sódico 10 mM (pH 4,5).

ELECTROFORESIS DE RNA

- **MOPS 10X:** MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM y EDTA 1 mM (pH 7,2). [**MOPS**, Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico].
- **SSC 10X:** NaCl 1,5 M y citrato sódico 150 mM (pH 7).
- **TC_{RNA}:** Formamida desionizada 60%, formaldehído 6%, MOPS 1X, azul de bromofenol 0,25%, xilenecianol FF 0,25%, bromuro de etidio 0,1% y glicerol 10%.
- **Tampón de carga Urea Dye 2X:** Urea 10,5 M, EDTA 0,1 M, azul de bromofenol 0,25% y xilenecianol FF 0,25%.

ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT

- **Solución lavado 1:** SSC 2X y SDS 0,1%.
- **Solución lavado 2:** SSC 1X y SDS 0,1%.
- **Solución prehibridación:** Fosfato sódico 0,5 M (pH 7,2), SDS 7% y EDTA 10 mM (pH 8).

SÍNTESIS *IN VITRO* Y MARCAJE RADIOACTIVO DE RNA

- **Tampón E:** Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), acetato sódico 0,25 M, SDS 0,25% y EDTA 1 mM.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES CIANOBACTERIANOS

- **Tampón de Extracción:** Tris-HCl 50 mM (pH 8), β -mercaptoetanol 2 mM, y cóctel inhibidor de proteasa *cOmplete™ ULTRA Tablets, EDTA-free (Roche)*.

MÉTODO DE LOWRY

- **Solución A:** Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, tartrato sódico-potásico 0,16 % y SDS 1%.
- **Solución B:** $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

- **Tampón Running 10X:** Tris base 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) y 0,1% SDS.
- **TC_{prot} :** Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2,5%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,25%.

TINCIÓN DE PROTEÍNAS

- **Coomassie R-250:** azul de Coomassie R-250 0,25%, ácido acético 10% y metanol 45%.
- **Solución de desteñido:** Metanol 45% y ácido acético 10%.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- **Tampón A:** Fosfato sódico 20 mM (pH 7,2) y NaCl 0,5 M.
- **Tampón B:** Fosfato sódico 20 mM (pH 7,2), NaCl 0,5 M e Imidazol 1M.
- **Tampón F:** Fosfato sódico 1 M (pH 7,2) y NaCl 150 mM.

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

- **Solución de bloqueo:** PBS 1X, Tween-20 0,1% y leche en polvo desnatada (*Applichem*) 5%.
- **PBS:** Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM.

ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

- **Tampón de unión 2,5X:** HEPES-NaOH 30 mM (pH 8), Tris-HCl 10 mM (pH 8), KCl 250 mM, EDTA 1,25 mM (pH 8), glicerol 10%, y MgCl_2 5 mM. [HEPES, Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico].
- **Tampón P:** Fosfato sódico 20 mM (pH 7,2), NaCl 150 mM y glicerol 10%.

3. RESULTADOS

3.1. CAPÍTULO I

NsiR3, un sRNA cuya expresión se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado

3. RESULTADOS

3.1. NsiR3, un sRNA cuya expresión se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado

3.1.1. Identificación de NsiR3 en *Nostoc* sp. PCC 7120

En el análisis de dRNA-Seq realizado en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b), se identificó un TSS (*Transcription Start Site*) en la posición 5452083f que corresponde a un transcrito que se induce significativamente en ausencia de nitrógeno combinado. Este TSS se encuentra situado en la región intergénica, de 319 pb, comprendida entre dos marcos abiertos de lectura anotados, *asl4557* y *all4558*. Asimismo, en otro experimento de RNA-Seq disponible en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Flaherty *et al.*, 2011), también se observó una transcripción regulada por nitrógeno en dicha región. La transcripción regulada a partir de este TSS se verificó experimentalmente mediante Northern blot, y el sRNA correspondiente se denominó NsiR3 (*nitrogen stress-induced RNA 3*) (Mitschke *et al.*, 2011b). En la Figura 3.1 se muestra una representación esquemática de *nsiR3* y su entorno genómico.

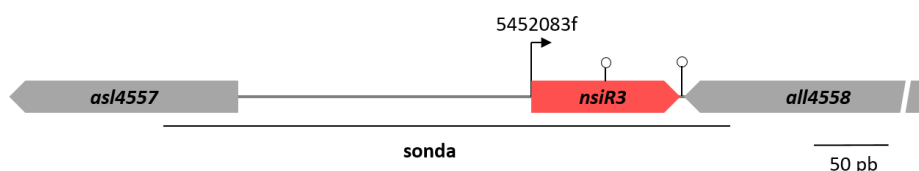


Figura 3.1. Representación esquemática de la región que codifica NsiR3 en *Nostoc* sp. PCC 7120. Se indican en gris los dos marcos de lectura abiertos que flanquean *nsiR3* (en rojo), junto con la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot. La flecha negra indica el inicio de la transcripción en la posición 5452083f (Mitschke *et al.*, 2011b). Los lazos indican posibles terminadores transcripcionales para *nsiR3*.

Por otro lado, a través de un acercamiento realizado en nuestro laboratorio para la identificación global de sRNAs conservados filogenéticamente en cianobacterias (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), se identificó a NsiR3 como un sRNA filogenéticamente conservado en todos los genomas de las cianobacterias formadoras de heterocistos. El alineamiento de las secuencias que codifican homólogos de NsiR3 identificados en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), así como la predicción de la estructura secundaria de los sRNAs correspondientes (Figura 3.2), permite la identificación de dos posibles terminadores transcripcionales independientes de Rho. Uno de estos terminadores se encuentra entre las posiciones 5452104 y 5452127 del genomio de *Nostoc* sp. PCC 7120, generando un sRNA de aproximadamente 45 pb, al que hemos denominado NsiR3S. Además, en *Nostoc* sp. PCC 7120 y algunas cianobacterias muy cercanas filogenéticamente a ella, la región conservada se extiende hasta otro posible terminador transcripcional independiente de Rho, situado entre las posiciones 5452149 y 5452182, de manera que se podría producir una versión extendida de NsiR3, de aproximadamente 100 pb, a la que hemos denominado NsiR3L. Este segundo terminador está constituido por secuencias STRR (*short tandemly repeated repetitive*), repeticiones imperfectas de 7 nucleótidos que se encuentran en los genomas de cianobacterias filamentosas (Mazel *et al.*, 1990; Vioque, 1997).

En la Figura 3.3 puede observarse la expresión de dos transcritos de aproximadamente 45 y 100 nucleótidos, que corresponderían a las dos versiones de NsiR3 descritas anteriormente, cuya transcripción se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado. Se observa que la versión larga de NsiR3 es la más abundante en *Nostoc* sp. PCC 7120, motivo por el que se decidió utilizar dicha versión a lo largo de este trabajo.

3.1.2. Regulación de la expresión de *nsiR3* por NtcA

Como se ha descrito en la Introducción, en las cianobacterias la regulación transcripcional de la respuesta al estrés nutricional por carencia de nitrógeno está comúnmente operada de forma directa a través de la unión de NtcA, el regulador global de la asimilación de nitrógeno, a secuencias específicas conservadas en los promotores de los genes regulados. Dado que la transcripción de NsiR3 depende de NtcA (Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016) , se decidió analizar si NtcA actúa directamente sobre el promotor de este sRNA.

En primer lugar, se comparó la secuencia del promotor de *nsiR3* de *Nostoc* sp. PCC 7120 con las secuencias promotoras de los homólogos de NsiR3 identificados (Figura 3.4). En todos los promotores de los genomas analizados se encontró un posible motivo de unión de NtcA (GTN₁₀AC) conservado (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014; Giner-Lamia *et al.*, 2017), que en este promotor en concreto corresponde a GTKN₈YAC. Este posible motivo de unión de NtcA conservado está situado 22 nucleótidos aguas arriba de una posible caja -10, una posición descrita en varios promotores activados por NtcA (Mitschke *et al.*, 2011; Picossi *et al.*, 2014).

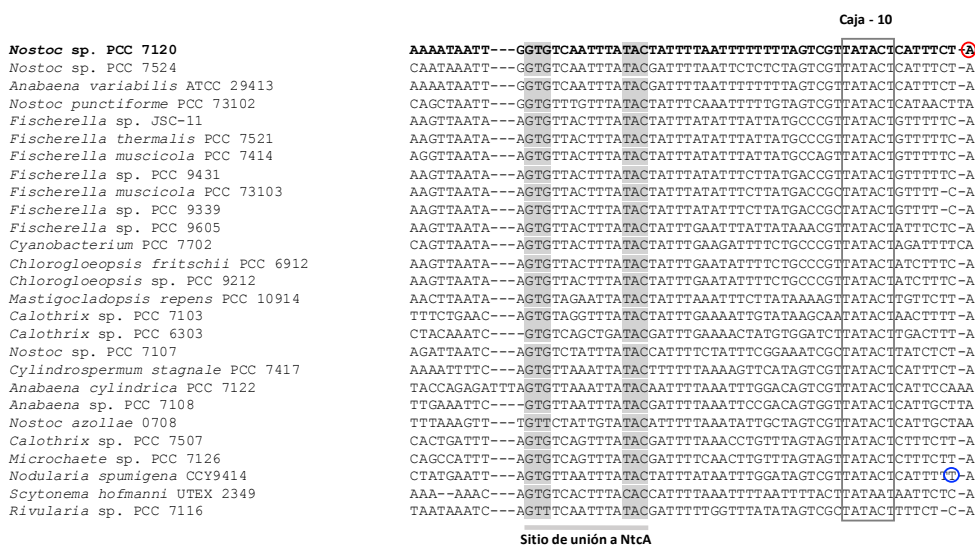


Figura 3.4. Comparación de las secuencias promotoras de los homólogos de NsiR3 identificados en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). La secuencia de *Nostoc* sp. PCC 7120 se muestra en negrita. El TSS verificado en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b) aparece marcado con un círculo rojo, mientras que el TSS verificado en *Nodularia spumigena* CCY9414 (Voß *et al.*, 2013) se señala con un círculo azul. Se resaltan en gris los posibles sitios de unión de NtCA. La posible caja -10 se enmarca en un recuadro.

Al objeto de verificar la posible interacción entre NtcA y la región promotora de NsiR3, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética con proteína NtcA purificada, y un fragmento de DNA, que se extiende desde -118 a +31 con respecto al TSS de *nsiR3*, que incluye la posible secuencia de unión de NtcA. Como se observa en la Figura 3.5, en presencia de la proteína NtcA se produce un retardo del fragmento de DNA que contiene la secuencia promotora de *nsiR3*. Sin embargo, la cantidad de fragmento unido a NtcA es significativamente menor cuando el ensayo se realiza con un fragmento de DNA que contiene una versión del promotor de *nsiR3* con el posible sitio de unión de NtcA mutado (GTG se cambió a CAC). La mutagénesis se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 469 y 23, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 420 y 421 (Tabla 2.5). Estos resultados demuestran la unión de NtcA a una secuencia específica del promotor de NsiR3 centrada alrededor de la posición -41,5 con respecto al TSS. Estas observaciones son compatibles con la activación directa de la transcripción del promotor de NsiR3 por NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado.

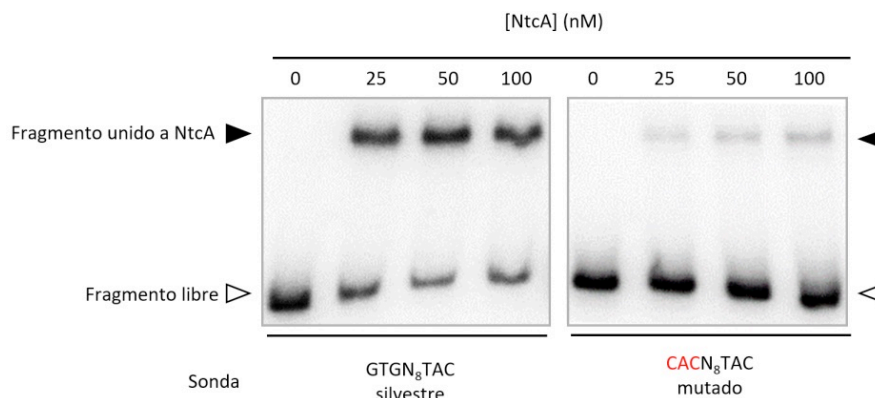


Figura 3.5. Unión de la proteína NtcA a la región promotora de NsiR3. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética con proteína NtcA purificada. Se utilizó como sonda un fragmento de DNA de 149 pb, obtenido por PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 469 y 23, que contiene el promotor de NsiR3 de *Nostoc* sp. PCC 7120, y que está marcado en los extremos 5' con [γ - 32 P]-ATP. En el panel de la izquierda se muestra el experimento realizado con la versión silvestre del promotor. En el panel de la derecha se muestra el experimento realizado con una versión mutada del promotor, alterada en las posiciones señaladas en rojo. La posición de los fragmentos de DNA retardados se indica con un triángulo negro, mientras que los fragmentos libres se indican con triángulos vacíos.

3.1.3. Selección de posibles mRNAs diana de NsiR3

Para la identificación de posibles mRNAs regulados por NsiR3 se utilizaron varios acercamientos. En primer lugar, en nuestro laboratorio está disponible un análisis global del transcriptoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de una estirpe mutante que carece de NsiR3 (Δ *nsiR3*). Esta estirpe (proporcionada por la Doctora Elvira de Olmedo-Verd) fue generada mediante el proceso de doble recombinación por delección descrito en el apartado 2.2.9.3, procedimiento

mediante el cual se eliminó la región de DNA que contiene *nsiR3*. El análisis global del transcriptoma de estas estirpes fue llevado a cabo mediante un experimento de hibridación de *microarrays* (datos no publicados) en el que se compararon, en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta nsiR3$, los cambios transcripcionales que ocurren cuando células cultivadas en presencia de amonio se transfieren a un medio sin nitrógeno combinado durante 8 horas. A partir de los resultados se identificaron siete genes, *alr2346*, *all3327*, *all2740*, *alr3410*, *all2806*, *all0298* y *alr0607* (*nirA*), cuya expresión era significativamente mayor en el mutante $\Delta nsiR3$ que en la estirpe silvestre (Figura 3.6), lo que podría sugerir que estuvieran regulados negativamente por NsiR3. De entre todos ellos se seleccionaron para su estudio cuatro genes, *alr3410*, *all2806*, *alr0607* (*nirA*) y *all3327*, para los que la aplicación del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) predice una posible interacción con NsiR3 en una zona próxima al codón de inicio de la traducción del mRNA (Figura 3.7). La información obtenida del análisis de los datos del experimento de *microarray* para estos cuatro genes se recoge en la Tabla 3.2.

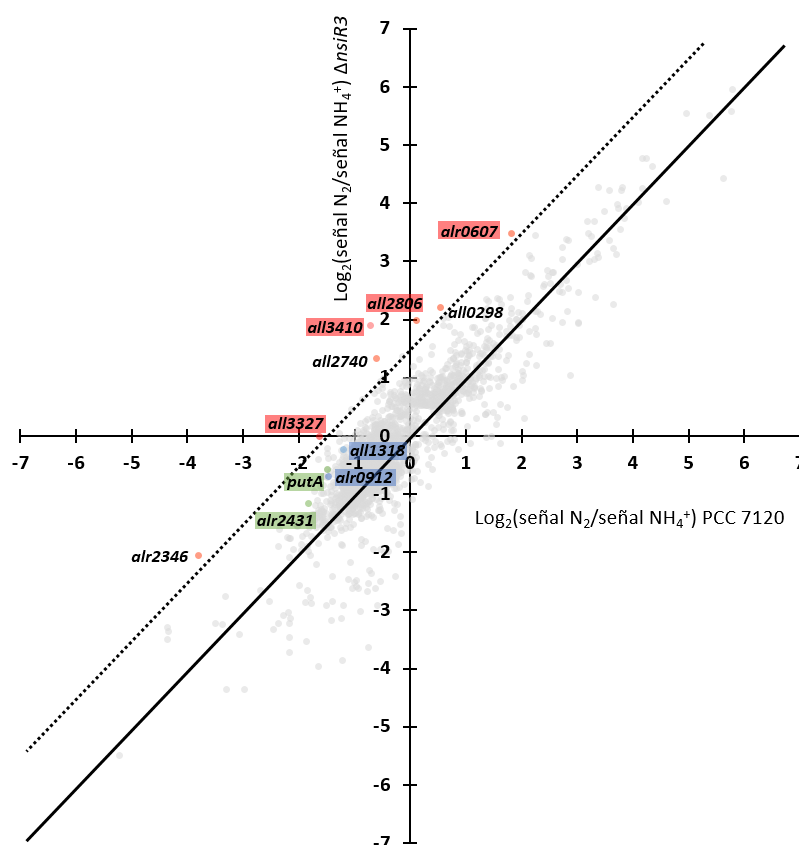


Figura 3.6. Comparación entre la estirpe *Nostoc* sp. PCC 7120 y la estirpe mutante $\Delta nsiR3$ de los cambios transcripcionales que ocurren tras 8 horas (N_2) en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado. Cada punto representa un gen o elemento del experimento de hibridación de *microarrays* con p-value <0,005. En el eje x se representa, para la estirpe silvestre, la diferencia (\log_2) en la señal detectada cuando el *microarray* se hibrida con RNA extraído tras 8 horas (N_2) en ausencia de nitrógeno combinado con respecto a la señal detectada con RNA extraído de células cultivadas en amonio (NH_4^+). En el eje y se representan los mismos datos para la estirpe $\Delta nsiR3$. Los elementos situados sobre la línea discontinua tienen una expresión significativamente mayor ($\Delta \log_2$ del cambio de expresión > 1,5) en el mutante $\Delta nsiR3$ que en el silvestre. Se resaltan en rojo aquellos genes seleccionados para su análisis posterior en base a este criterio. Se muestran también los genes seleccionados en base a otros criterios (ver más adelante), como la correlación con NsiR3 en la red de coexpresión (en verde) o la predicción de dianas por parte del algoritmo CopraRNA (en azul) (Tabla 3.1).

Por otro lado, en el laboratorio se ha elaborado una red de coexpresión que correlaciona los genes cuya expresión cambia en función de la disponibilidad de nitrógeno (Brenes-Álvarez, datos no publicados). A partir de los datos de esta red se han podido identificar dos genes, *alr0540* (*putA*, *proline utilization A*) y *alr2431*, cuyos cambios de expresión tienen una correlación negativa significativa con los cambios de expresión de NsiR3 en función de la disponibilidad de nitrógeno. Además, ambos genes presentan una diferencia en los cambios de expresión detectados en el análisis de los datos del experimento de *microarray* (véase Figura 3.6), consistentes con lo esperado para genes potencialmente reprimidos por NsiR3 (véase Tabla 3.2). La predicción de posibles interacciones entre estos dos mRNAs y NsiR3 mediante IntaRNA (Figura 3.7) indica que dichas interacciones tendrían lugar en la región 5'UTR (UTR "*Untranslated región*") de los mRNAs, por lo que *putA* y *alr2431* se seleccionaron también para su estudio.

Finalmente, al objeto de identificar otros posibles mRNAs regulados por NsiR3, se empleó el algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014), que utiliza información relativa a la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas en organismos relacionados. Además, CopraRNA tiene en cuenta el plegamiento y la energía de hibridación a la hora de predecir la posible zona de interacción entre el sRNA y su diana. Para la predicción se utilizaron las secuencias de NsiR3S de *Nostoc* sp. PCC 7120, *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417, *Nostoc azollae* 0708, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nostoc* sp. PCC 7524, *Nostoc* sp. PCC 7107 y *Calothrix* sp. PCC 7507. En la Tabla 3.1 se presenta una lista de los 30 genes con mayor puntuación predichos por CopraRNA como posibles candidatos a interactuar con NsiR3. De entre todos ellos se seleccionaron para su estudio los genes *all1873*, *alr2933*, *alr2372* y *all3865*, que aparecen posicionados como los cuatro mejores candidatos a interactuar con NsiR3. La predicción según IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) de la interacción entre *all1873* y *alr2933* con NsiR3 tendría lugar en la región 5'UTR de estos mRNAs (Figura 3.7). En el caso del mRNA de *alr2372*, la interacción tendría lugar en la región codificante, a unos 72 nucleótidos del inicio de la traducción, mientras que la interacción con *all3865* solaparía el inicio de la traducción.

Tabla 3.1. mRNAs candidatos a interactuar con NsiR3 según la predicción de CopraRNA.

Posición	p-value	Gen	Anotación
1	$1,10 \times 10^{-10}$	<i>all1873</i>	
2	$7,53 \times 10^{-09}$	<i>alr2933</i>	Proteína unida a membrana. Transglicolasa
3	$9,78 \times 10^{-09}$	<i>alr2372</i>	Transportador ABC, proteína de unión a ATP
4	$1,51 \times 10^{-05}$	<i>all3865</i>	Proteína A, biosíntesis del cofactor de molibdeno
5	$1,59 \times 10^{-05}$	<i>alr4898</i>	Regulador transcripcional
6	$2,93 \times 10^{-05}$	<i>all3600</i>	Quinasa de respuesta adaptativa
7	$3,05 \times 10^{-05}$	<i>all1591</i>	Histidinol deshidrogenasa
8	$4,57 \times 10^{-05}$	<i>alr5300</i>	Proteína ribosomal L11
9	$7,04 \times 10^{-05}$	<i>all2971</i>	
10	$9,09 \times 10^{-05}$	<i>alr4068</i>	Transportador ABC, proteína de unión a ATP
11	$1,18 \times 10^{-04}$	<i>all4008</i>	Piruvato quinasa
12	$1,43 \times 10^{-04}$	<i>alr2111</i>	
13	$1,51 \times 10^{-04}$	<i>alr2304</i>	Peptidasa de señal
14	$1,59 \times 10^{-04}$	<i>alr2532</i>	Transportador ABC de azúcares, permeasa
15	$1,60 \times 10^{-04}$	<i>asl4565</i>	
16	$1,77 \times 10^{-04}$	<i>asr4470</i>	
17	$1,92 \times 10^{-04}$	<i>all3259</i>	
18	$2,05 \times 10^{-04}$	<i>all0218</i>	Piridoxina-5'-fosfato sintasa
19	$3,93 \times 10^{-04}$	<i>alr1967</i>	Regulador de respuesta de dos componentes
20	$4,06 \times 10^{-04}$	<i>all1780</i>	Precorrina reductasa
21	$4,54 \times 10^{-04}$	<i>all1043</i>	
22	$6,37 \times 10^{-04}$	<i>alr5066</i>	UDP-N-acetilenolpiruvoylglucosamina reductasa
23	$8,37 \times 10^{-04}$	<i>alr0543</i>	Transportador ABC, proteína de unión a sustrato
24	$1,10 \times 10^{-03}$	<i>alr3577</i>	
25	$1,16 \times 10^{-03}$	<i>alr4542</i>	Posible metiltransferasa
26	$1,17 \times 10^{-03}$	<i>all1318</i>	Valil-tRNA sintetasa
27	$1,22 \times 10^{-03}$	<i>all0271</i>	Metaloproteasa
28	$1,24 \times 10^{-03}$	<i>all0538</i>	Posible metiltransferasa
29	$1,32 \times 10^{-03}$	<i>alr3668</i>	Subunidad beta de la ureasa
30	$1,45 \times 10^{-03}$	<i>alr0912</i>	Era, Proteína de unión a GTP

Se muestran los 30 genes predichos por el algoritmo CopraRNA como posibles mRNAs diana de NsiR3 con mayor puntuación. El algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014) está implementado en el servidor de Freiburg RNA Tools (apartado 2.10). Para el análisis se utilizaron las secuencias de NsiR3S de *Nostoc* sp. PCC 7120, *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417, *Nostoc azollae* 0708, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nostoc* sp. PCC 7524, *Nostoc* sp. PCC 7107 y *Calothrix* sp. PCC 7507. Aparecen resaltados en negrita aquellos genes que se han analizado en este trabajo. Además, se muestran en azul aquellos genes que en el *microarray* tienen una expresión ($\Delta \log_2$ del cambio de expresión > 0,6) (Tabla 3.2).

Por último, entre los candidatos de la predicción por CopraRNA (Tabla 3.1) hay dos genes, *all1318* y *alr0912*, que, aunque aparecen con peor puntuación que los seleccionados anteriormente, presentan una diferencia en los cambios de expresión detectados en el análisis de los datos del experimento de *microarray* (véase Figura 3.6) consistentes con lo esperado para genes reprimidos por NsiR3 (véase Tabla 3.2). La predicción de la interacción entre estos genes y NsiR3 mediante IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) muestra que dichas interacciones tendrían lugar en la región 5'UTR de los mRNAs (Figura 3.7). Teniendo en cuenta todas estas observaciones, *all1318* y *alr0912* se seleccionaron también para su estudio.

Tabla 3.2. Información de aquellos genes candidatos a interactuar con NsiR3 que presentan cambios significativos en el análisis del *microarray*.

Gen ^a	$\Delta\log_2$ (ΔnsiR3 - PCC 7120) ^b	p-value	Anotación ^c
<i>all3410</i>	2,58	$7,85 \times 10^{-04}$	Subunidad alfa de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa
<i>all2806</i>	1,84	$2,78 \times 10^{-04}$	
<i>alr0607</i>	1,62	$9,04 \times 10^{-06}$	
<i>all3327</i>	1,59	$1,05 \times 10^{-03}$	Nitrito reductasa (NirA)
<i>all1318</i>	0,93	$7,80 \times 10^{-04}$	
<i>alr0540</i> (<i>putA</i>)	0,88	$3,38 \times 10^{-11}$	
<i>alr0912</i>	0,73	$4,27 \times 10^{-10}$	Era, Proteína de unión a GTP
<i>alr2431</i>	0,63	$6,45 \times 10^{-13}$	

^a Se resaltan en rojo aquellos genes seleccionados exclusivamente en base al análisis de los datos del experimento de *microarray* (Figura 3.6). En azul se muestran los genes con cambios de expresión significativos en el *microarray* que además aparecen en la predicción computacional utilizando el algoritmo CopraRNA (Tabla 3.1). En verde se señalan aquellos genes candidatos identificados a través de la red de coexpresión.

^b Se muestra la información ($\log_2(\text{señal N}_2/\text{señal NH}_4^+) \Delta\text{nsiR3} - \log_2(\text{señal N}_2/\text{señal NH}_4^+) \text{PCC 7120}$), obtenida del análisis de los datos del experimento de *microarray*, de posibles mRNAs candidatos a interactuar con NsiR3 que tienen un $\Delta\log_2$ del cambio de expresión $> 0,6$ y que, además presentan un p-value $< 0,005$.

^c Para la anotación de los genes se utilizó la base de datos Cyanobase (apartado 2.10).

Por lo tanto, a modo de resumen, se han seleccionado para su estudio un grupo de genes compuesto por *alr3410*, *all2806*, *all3327* y *alr0607*, seleccionados a partir del análisis de los datos de hibridación de *microarrays*; *putA* y *alr2431*, identificados a través de la red de coexpresión; y, *all1873*, *alr2933*, *alr2372*, *all3865*, *all1318* y *alr0912*, seleccionados a partir de la predicción computacional con el algoritmo CopraRNA. Las posibles interacciones entre NsiR3 y cada uno de los mRNAs se muestran en la Figura 3.7.

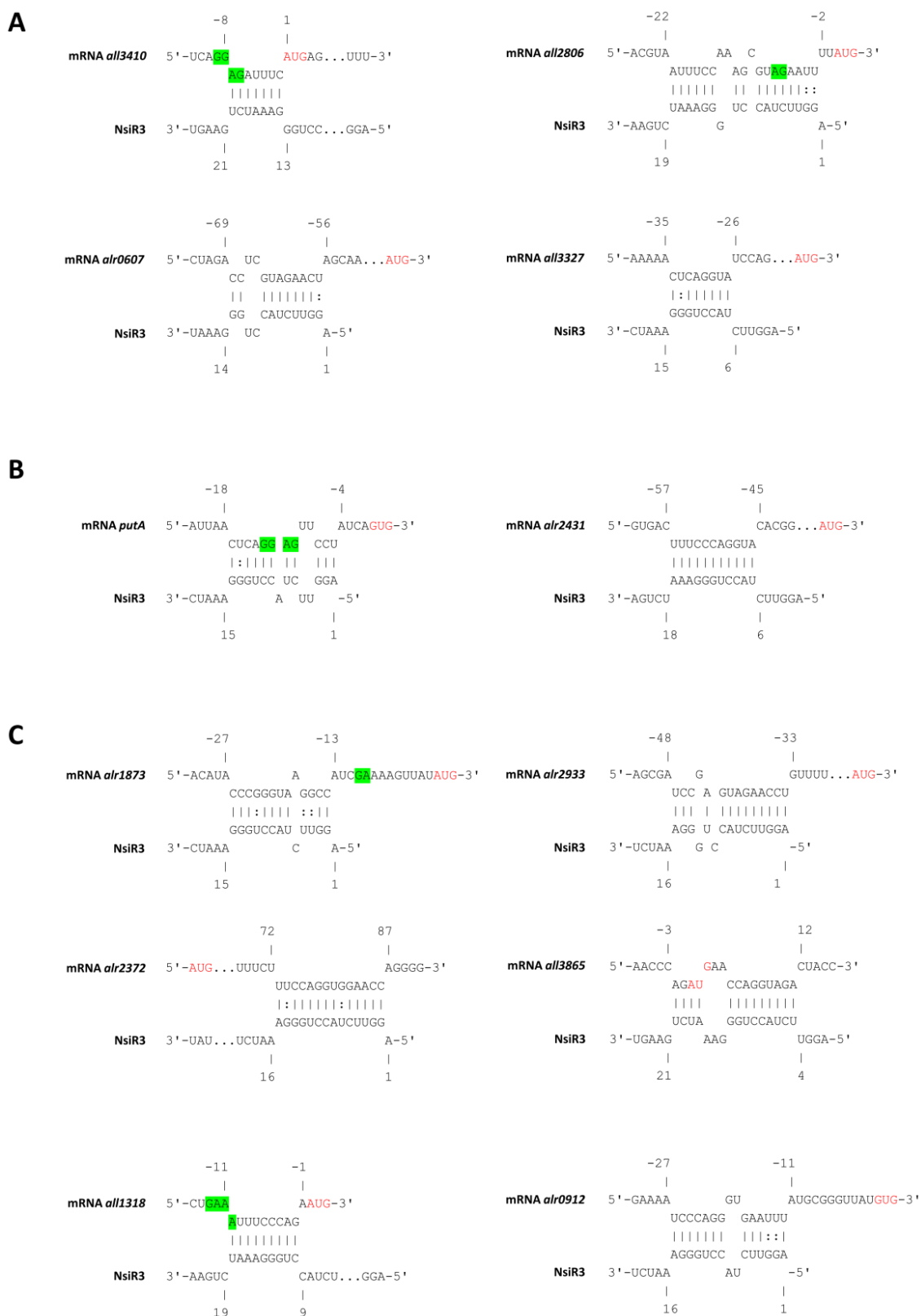


Figura 3.7. Interacciones entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados para su estudio. Se muestran las interacciones entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados en base a los experimentos de hibridación de *microarrays* (A), en base a la correlación con NsiR3 en la red de coexpresión (B), y en base a la predicción de dianas con el algoritmo CopraRNA (C). En todos los casos, las interacciones que se muestran derivan de la aplicación del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), que está implementado en el servidor de Freiburg RNA Tools (apartado 2.10). La predicción se realizó con la secuencia completa de NsiR3L y la región comprendida entre -200 y +100 de los mRNA diana. Los nucleótidos de los mRNAs diana se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG, GUG en el caso de *alr0912* y *putA*, aparece señalado en rojo, y las posibles secuencias Shine-Dalgarno resaltadas en verde.

3.1.4. Validación de la interacción entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados

Para verificar la interacción entre NsiR3 y los mRNAs candidatos seleccionados se usó el sistema heterólogo implementado en *E. coli* descrito en el apartado 2.6. Dado que algunos mRNAs, como los de *putA* y *alr0912*, tienen GTG como codón de inicio de la traducción, y al objeto de mejorar la eficiencia de la traducción en *E. coli*, el codón de inicio GTG de estos genes se reemplazó por ATG mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2. La Tabla 3.3 muestra la información relativa a las construcciones utilizadas para la validación en *E. coli* de la interacción de NsiR3 con los mRNAs seleccionados como posibles dianas.

Tabla 3.3. Secuencias de los insertos clonados para la validación, mediante el sistema heterólogo en *E. coli*, de la interacción entre NsiR3 y los mRNAs seleccionados como posibles dianas.

Gen	TSS	Secuencia clonada	Plásmido	Plásmido resultante
<i>alr3410</i>	-219	<p>atgcATGTGAAGCGATTGGCAACTATCAGCAAATTGGAAATTTGCCAGATGCTCAGAAAAGCTTTGTCTGTTGCATCACCAGAGTTAAGGGGAACGCTCAAGTTTCAATCAAAAAGGAAAATCAATTTTTCATAGCTCGGCGTAAGAGCCATGAGTGAATGACATTCCTCATAAGCAAAGTTGCAGATTTTGCAGAGATTAGGTATTTATCTTCAGGAGATTTTCATGAGAATAGCAGTTGCTAAAGAAATTGAAGTTTGTGAA</p> <p>CGACGTGTAGCCTTAAATCCTGctagc</p>	pXG-10-SF	pIAE52
<i>all2806</i>	-249	<p>atgcatTATAAAGAATAAACATCACTAATTTTAGGTAAGTTTTGATGTCAATGAAATCCCCCTAATTCAGGTGCTAGTTAACTACTTGAACTCAACAGAAATCAACCTGAATGGCGTTGGCTGGGGGTAGATGATGAGTGAAATCGAGAAAAACAAGACGTTTACTAATGCTGTGTTGTCAACCATACAGCAAGAAAGTATTTCTTTGATAACCGCAAGTATCTCACACGTAATTTCCAAAGCGTAGAATTTTATGTCTCAGAGCAGTGCAAATACAGCAGCCTTACATTTAAGTGAAAAGCTACCTTTTCCGctagc</p>	pXG-10-SF	pIAE50
<i>all3327</i>	-182	<p>atgcATATTGTTGCATTTGACACAATCTGGATAAAAAAAGGCTAATCTGCTCAGTTAATTGAGGACAAATTTTACTGAAACAGGAGAACTTTCTAATTTATTAATTTTACTCTTGTGTCATAACTTATAATCCCAATTTCCAAAAAACTCAGGTATCCAGTTGATTCATTGGGGGTTTCCTATGATATCCGATGCAATGAGGCTGATACAGGTGCTTTGCAACGCTACATTCTTGAATTTGctagc</p>	pXG-10-SF	pIAE51
<i>alr0607</i>	-461	<p>atgcatTCGAAATCGTTACATAAACATTACACAAACCACTTGACAAATTTAGCCAATGTAAAAGACTACAGTTTCTCCCCGGTTTAGTTCTAGAGTTACCTTCAGTGAAACATCGGCGGCGTGTCACTCATTTGAAGTAGCATAAATCAATTCAAAATACCTGCGGGAAGGCTGCGCCAACAAAATTAATATTTGGTTTTTCACTATTAGAGCATCGATTCATTAATCAAAAACCTTACCCCCAGCCCCCTTCCCTTGTAAGGAAGTGGGAGCCAACTCCCTCTCCGCTCGGAGCGAAAAGTCTGAGCGGAGGTTTCTCCGAACAGAACTTTTAAAGAGAGAGGGGTTGGGGGAGAGGTTCTTTCAAGATTACTAAATTGCTATCACTAGACCTCGTAGAACTAGCAAAGACTACGGGTGGATTGATCTTGACAAAAAACTTTATGAGAACAGCTCATGACAGATACAGTAAC</p> <p>TACCCCAAAGCCAGCCTCAATAAGTTTGAGAAATTCAAAGCCGctagc</p>	pXG-10-SF	pIAE54
<i>alr0540 (putA)</i>	-62	<p>atgcatTCACAATAGAAAACCGGACTTTATATATAAGTCTGAAATTAACCTCAGGAGTTCCTATCAATGGTATTACAAGTACAAACAGCACCTACGAAGCGAAAACCTCAAGAAATTGCTAGACAAgctagc</p> <p>gc</p>	pXG-10-SF	pIAE48

Gen	TSS	Secuencia clonada	Plásmido	Plásmido resultante
<i>alr2431</i>	-67	atgcatTTGCTGTGACTTTCCAGGTACACGGTCTAGAACTTT AATTAATCAATAGACCTCGGAACATATAGATGATTACGCCAATG CGGGTTTTTGTGTTTAATTTTAAACGCTAATACGGAAAATGAAGG Ggctagc	pXG-10-SF	pIAE49
<i>all1873</i>	-29	atgcatTACCCGGGTAAGGCCATCGAAAAGTTATATGCAAACT AAGCAAAAGGTTACGTTATATCTATCGCCAGAACTGCACAAAAA GCTGAAGgctagc	pXG-10-SF	pIAE6
<i>alr2933</i>	-	atgcatTCCCGGATTGTAGCGATCCGAGTAGAACCTGTTTTT TTCTAGTGTGAAAGATTCAACTAAATGATAAGAAAAACCTTG CTTTGTTTTTCCTTAAGTCTGGGAATTGCTTTGGTAAATCCG AGC	pXG-30-SF	pIAE8
<i>alr2372</i>	-39	atgcatGATATTGTTGAGAATTGTATAGTTAGGGTCTAGCTGT CATGGCTCCCGCCGTTTTAATTCAAAATCTACAAAAGCGTTACG GTACTGTTGAAGCCGTCgctagc	pXG-10-SF	pIAE55
<i>all3865</i>	-	atgcatAATCGGGCTTTAGTCAGCGTGCAGAGGTTGATGAAGAA TCAAGTAGTAGAGAAATTGAGGTGAGGTTTCAAGCAGGGATCTA TAACGATCGCTCACAATAGAAAAATAAACCCAGATGAACCAGGT AGACTACCTCCGTATTAGCTTAATAGATCGCTGCAATTTTCGTT GTCAGgctagc	pXG-30-SF	pIAE57
<i>all1318</i>	-28	atgcatAGTCCTTCCAACTGAAATTTCCAGAAATGACCGCAA CTATAACCAATCTTCCAGTCTCTACGATCCGTTTACCACGTAA GCCAAGgctagc	pXG-10-SF	pIAE2
<i>alr0912</i>	-101	atgcatAGGCAGTTCCCCGAAAAATCCCAGGGTGAATTTATGCG GGTTATGTGTCTAAAGAAAAAACTAAGTTATCCCAGCTAGAAAA TATGACGGCGGAACATAAAATGGCTAGTATTGATAATCACATCT CCTCCTTATCAGGCGAAGTATCAATCCCCCAAGCTgctagc	pXG-10-SF	pIAE12
<i>nsiR3L</i>	-	GGTTCTACCTGGGAAATCTGAAGTGGCTTTGCCACTTCTTTTT ATGAGTGAATTGCCTGACTGAAAAAAGTAAAAAGTCATGATAG ATAACTTTTTACTTTTTTCTTTTTTAAATCGTTAGTCAATTCA TCTCGCCATTTCGTTTGAGTTTCCTAGAG	pZE12-luc	pIAE19

Se indica la posición del TSS (resaltado en rojo) identificado en (Mitschke *et al.*, 2011b), numerado con respecto al inicio de traducción, desde el que se realizan las fusiones de la región 5'UTR de los mRNAs con el gen *sfGFP* en pXG-10-SF. Nótese que las fusiones correspondientes a transcritos policistrónicos en el plásmido pXG-30-SF no se realizan desde el TSS, sino desde una posición situada 60 nucleótidos dentro del gen anterior (véase apartado 2.6). Las secuencias pertenecientes al cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 están en mayúscula. En negro se indican los nucleótidos de la secuencia que corresponden a la región 5'UTR del mRNA, mientras que en verde se señalan los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante de cada mRNA. Los nucleótidos en rojo y subrayados indican las mutaciones puntuales realizadas en *putA* y *alr0912* para reemplazar el codón de inicio de la traducción GTG por un codón ATG. Por su parte, en azul se indica la secuencia clonada en pZE12-luc, que contiene el gen *nsiR3L*, resaltado en gris. Los sitios NsiI, NheI y XbaI se resaltan en celeste, amarillo y rosa respectivamente. Por último, se indica el plásmido en el que se clona cada inserto, así como el plásmido resultante generado (Tabla 2.4).

Al objeto de analizar la posible regulación ejercida por NsiR3 sobre la traducción de los mRNAs seleccionados, se evaluaron los cambios en los niveles de proteína sfGFP mediante medidas de fluorescencia de las células de *E. coli* que portaban diferentes combinaciones de estos plásmidos (Figura 3.8A). El plásmido pJV300 (Sittka *et al.*, 2007), que codifica un sRNA no relacionado, se usó como control. Las medidas de fluorescencia de los cultivos líquidos de *E. coli* se analizaron mediante fluorimetría, tal y como se describe en el apartado 2.6. En los casos en los que los niveles de fluorescencia eran demasiado bajos para estimar de forma fiable las diferencias en la cantidad de proteína sfGFP entre el cultivo control y el cultivo en el que se

expresa NsiR3, se analizó la acumulación de la proteína sfGFP mediante Western blot utilizando un anticuerpo frente a GFP (Figura 3.8B), tal y como se describe en el apartado 2.4.6. Se espera que la interacción entre NsiR3 y el mRNA que se esté analizando en cada caso produzca una alteración de los niveles de fluorescencia o de la acumulación de proteína sfGFP con respecto a las células control, portadoras de la fusión mRNA::sfGFP correspondiente y pJV300.

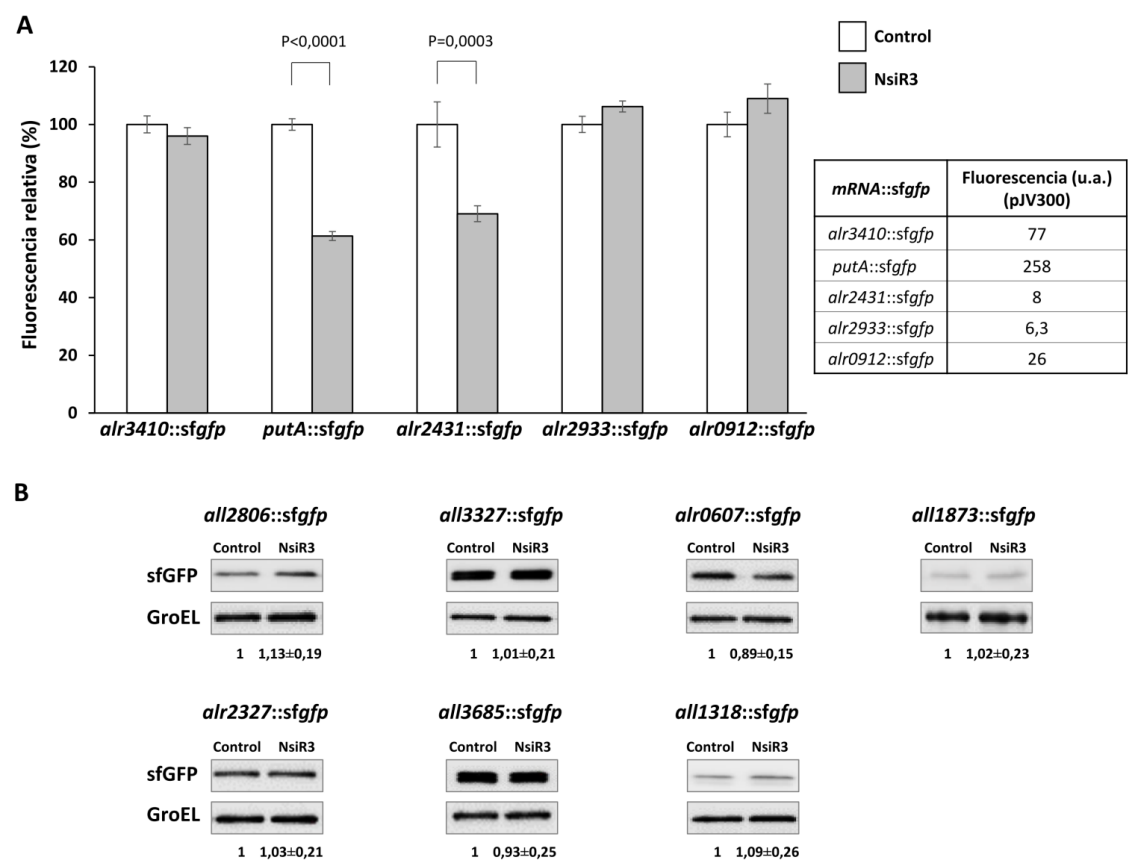


Figura 3.8. Verificación *in vivo* mediante un sistema heterólogo en *E. coli* de la interacción entre NsiR3 y la región 5'UTR de los mRNAs seleccionados. (A) Cuantificación de sfGFP mediante fluorescencia. Se representan los niveles de fluorescencia relativa de cultivos de *E. coli* que portan un plásmido con la fusión mRNA::sfGFP combinado con el plásmido control pJV300, o con el plásmido pIAE19, que codifica NsiR3. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas de fluorescencia de ocho cultivos provenientes de colonias independientes. Para el cálculo de estos valores de fluorescencia se normalizó por la cantidad de células ($A_{600\text{ nm}}$), y se restaron los niveles de fluorescencia de células que portan pXG-0, un plásmido control sin sfGFP. La fluorescencia de las células portadoras de las fusiones mRNA::sfGFP combinadas con el plásmido pJV300 se ha considerado en cada caso como 100%. Se indica la *p-value* correspondiente al test de *Student* en los casos en los que la diferencia de fluorescencia es significativa. La tabla muestra los valores de fluorescencia absolutos en unidades arbitrarias (u.a.) de las células que portan las fusiones mRNA::sfGFP combinadas con el plásmido control pJV300. **(B) Cuantificación de sfGFP mediante Western blot.** Western blot de células de *E. coli* que portan un plásmido con la fusión mRNA::sfGFP combinado con el plásmido control pJV300, o con el plásmido pIAE19, que codifica NsiR3. El análisis se realizó con anticuerpos comerciales frente a GFP o proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los números en la parte inferior de la imagen indican los niveles relativos de sfGFP con respecto al control, después de la normalización con la señal para GroEL. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de cuatro cultivos provenientes de colonias independientes.

En la Figura 3.8A sólo se observa una reducción significativa en los niveles de fluorescencia sfGFP en las células de *E. coli* en las que se coexpresa NsiR3 (pIAE19) en combinación con las fusiones traduccionales *putA::sfGFP* (pIAE48) o *alr2431::sfGFP* (pIAE49) (Tabla 2.4). La disminución de los niveles de fluorescencia en las células que portan estas dos fusiones traduccionales en presencia de NsiR3 con respecto a las células control es de un 40% en el caso de *putA*, y de un 30% en el caso de *alr2431*. Estos resultados sugieren una interacción directa entre NsiR3 y la región 5'UTR de *putA* y *alr2431*, que tendría como resultado en ambos casos una represión de su traducción. Como puede observarse en la Figura 3.8B, todas las fusiones traduccionales *mRNA::sfGFP* analizadas mediante Western blot mostraron unos niveles de proteína sfGFP detectables, lo que demuestra que la región del inicio de la traducción de estos mRNAs es funcional en *E. coli*. Sin embargo, en ninguna de estas fusiones se apreció una alteración de la acumulación de proteína sfGFP en presencia de NsiR3 con respecto a las células control.

Al objeto de verificar que la interacción entre NsiR3 y la región 5'UTR de *putA* y *alr2431* tiene lugar en la región predicha por IntaRNA (Figura 3.7), se introdujeron mutaciones puntuales mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2 en la región de la secuencia de NsiR3 que se predice que está implicada en la interacción con estos dos transcritos. El diseño de estas mutaciones puntuales se realizó con el apoyo del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). De este modo, una vez seleccionado el nucleótido a mutar, y antes de proceder con la mutación propiamente dicha, se repetía *in silico* la predicción de la interacción con el algoritmo IntaRNA, utilizando la secuencia de NsiR3 mutada. Se consideraba que un nucleótido era un buen candidato a mutar, si tras su mutación, la zona de interacción predicha cambiaba de posición, o su estabilidad se veía reducida con respecto a la predicción realizada con la secuencia silvestre. Por lo tanto, con la realización de estas mutaciones puntuales en la secuencia de NsiR3 se espera que la interacción entre este sRNA y los mRNAs se vea afectada, lo que se reflejaría en la supresión de la reducción en los niveles de fluorescencia observados. Además, se realizaron las correspondientes mutaciones compensatorias en la región 5'UTR de los mRNAs, evaluando con IntaRNA que la interacción volviera a ocurrir en las mismas posiciones y con una estabilidad similar a la de la interacción predicha entre las secuencias silvestres.

Las predicciones realizadas con el algoritmo IntaRNA (Figura 3.7) sugieren que la posible región de NsiR3 que interacciona con la región 5'UTR de estos dos mRNAs está comprendida entre los nucleótidos 1-15, en el caso de *putA*, y 6-18 en el caso de *alr2431*. Como puede observarse, existe una región de NsiR3, comprendida entre los nucleótidos 6-15,

que estaría implicada en ambas interacciones. Teniendo en cuenta estas predicciones, se introdujo una mutación puntual, cambio de G a C, en el nucleótido 14 de la secuencia de NsiR3 (Figura 3.9A). La mutagénesis se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 704 y 283, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 689 y 690 (Tabla 2.5). Esta versión mutada se denominó Mut-14, y el plásmido que contiene esta versión mutada en lugar de la versión silvestre se denominó pIAE61 (Tabla 2.4). Además, se introdujeron las correspondientes mutaciones compensatorias, cambio de C a G, en el nucleótido -17 de la región 5'UTR de *putA* (versión Comp-14*17), y en el nucleótido -53 de la región 5'UTR de *alr2431* (versión Comp-14*53) (Figura 3.9A). De nuevo, las mutagénesis se realizaron mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 645 y 646, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 718 y 719, en el caso de *putA*. En el caso de *alr2431*, se utilizaron como cebadores externos los oligonucleótidos 649 y 650, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 720 y 721 (Tabla 2.5). Los plásmidos que portaban estas versiones mutadas se denominaron pIAE62 (versión Comp-14*17) y pIAE63 (versión Comp-14*53) (Tabla 2.4).

Una vez realizadas estas mutaciones, se evaluaron los cambios en los niveles de fluorescencia de las células de *E. coli* que portaban diferentes combinaciones de estos plásmidos. Las medidas de fluorescencia de los cultivos líquidos de *E. coli* se llevaron a cabo mediante fluorimetría (Figura 3.9B) y citometría de flujo (Figura 3.9C) según se describe en el apartado 2.6. Los niveles de fluorescencia de las células que portan las fusiones a *sfgfp* de la región 5'UTR silvestre de *putA* o de *alr2431* combinada con la versión mutada de NsiR3 (Mut-14), son similares a los de las células portadoras de dichas fusiones combinadas con el plásmido pJV300 (control). Esta observación sugiere que la mutación de este nucleótido de NsiR3 reduce drásticamente la interacción entre este sRNA y la región 5'UTR de estos dos mRNAs. Además, cuando se combina la versión mutada de NsiR3 con la fusión portadora de una mutación compensatoria en la región 5'UTR de *putA*, se observa de nuevo una reducción significativa en los niveles de fluorescencia, similar a la obtenida con la combinación de los transcritos silvestres, confirmándose que la interacción de NsiR3 con la región 5'UTR del mRNA de *putA* tiene lugar a través de los nucleótidos predichos por IntaRNA, así como el efecto de dicha interacción sobre la traducción de la proteína PutA. Sin embargo, cuando se combina la versión mutada de NsiR3 con la correspondiente versión con una mutación compensatoria en la región 5'UTR de *alr2431*, no se aprecia una reducción en los niveles de fluorescencia. Estos datos sugieren que estos dos nucleótidos no interaccionarían entre sí, aunque si estarían implicados en la interacción entre estas dos moléculas de RNA.

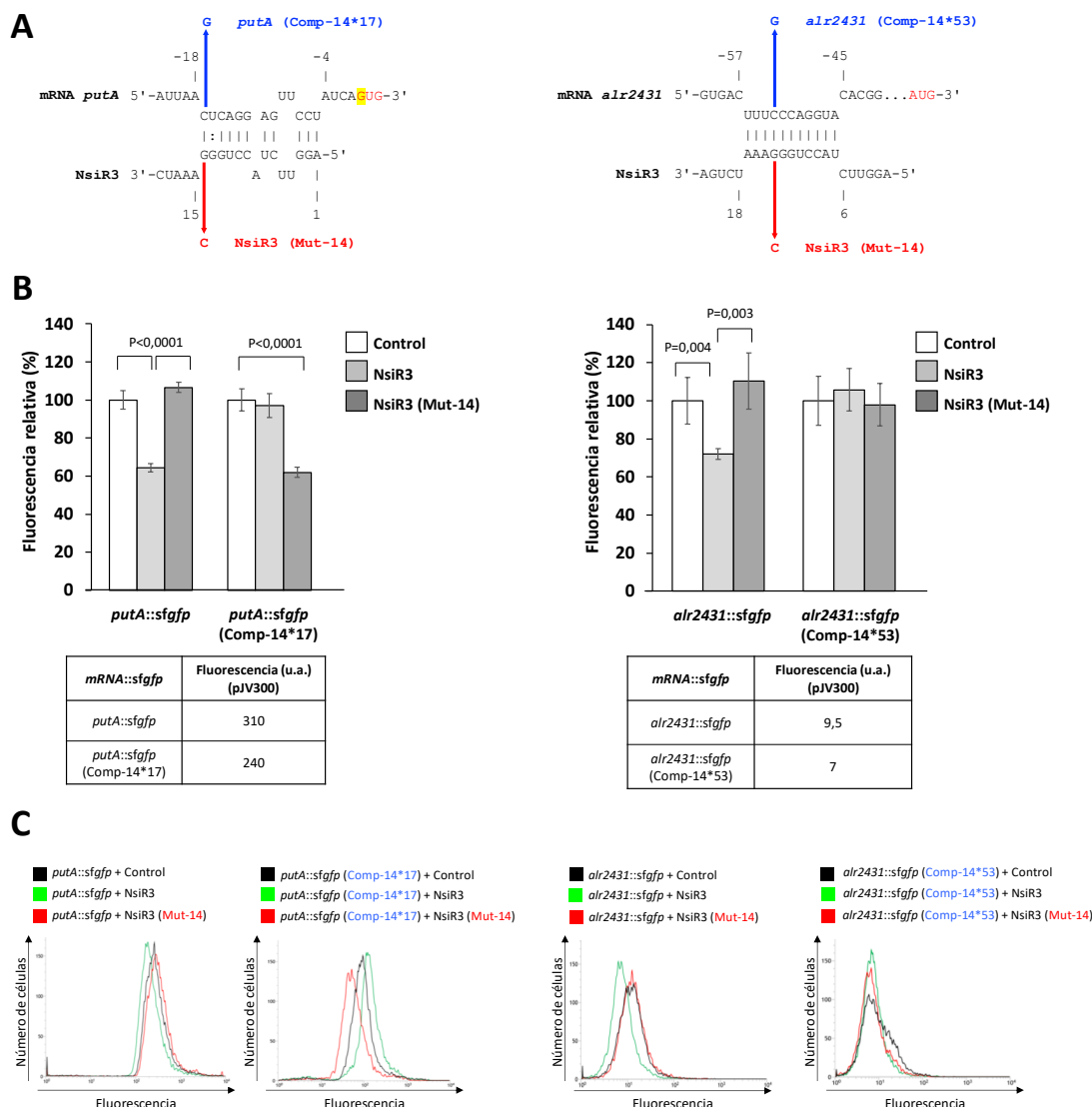


Figura 3.9. Verificación *in vivo* mediante un sistema heterólogo en *E. coli* de las interacciones entre NsiR3 y la región 5'UTR de *putA* y de *alr2431*. (A) Interacciones entre NsiR3 y la región 5'UTR de *putA* (izquierda) y de *alr2431* (derecha) según las predicciones del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). Los nucleótidos de *putA* y *alr2431* se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG aparece señalado en rojo. El codón de inicio de la traducción de *putA* es GUG. Se resalta en amarillo la mutación, cambio de G a A, llevada a cabo en el codón de inicio de *putA* para mejorar la eficiencia de la traducción en *E. coli*. La mutación introducida en NsiR3 en la posición 14 (Mut-14) está indicada en rojo. Las correspondientes mutaciones compensatorias, Comp-14*17 (izquierda) y Comp-14*53 (derecha), en las posiciones -17 y -53 de la región 5'UTR de *putA* y de *alr2431* respectivamente, están indicadas en azul. (B) **Cuantificación de sfGFP mediante fluorescencia. Se representan los niveles de fluorescencia relativa de cultivos de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con las versiones Comp-14*17 o Comp-14*53 de las fusiones *putA::sfGFP* y *alr2431::sfGFP* respectivamente, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsiR3, la versión Mut-14 de NsiR3, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas de fluorescencia de ocho cultivos provenientes de colonias independientes. Para el cálculo de estos valores de fluorescencia se normalizó por la cantidad de células ($A_{600\text{ nm}}$), y se restaron los niveles de fluorescencia de células que portan pXG-0, un plásmido control sin *sfGFP*. La fluorescencia de las células portadoras de las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300 se considera en cada caso como 100%. Se indica el *p-value* correspondiente al test de *Student* en los casos en los que la diferencia de fluorescencia es significativa. La tabla muestra los valores de fluorescencia absolutos en unidades arbitrarias (u.a.) de las células conteniendo las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300. (C) **Cuantificación de sfGFP mediante citometría de flujo.** Los ensayos se realizaron con cultivos en estado estacionario de las estirpes de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con las versiones Comp-14*17 o Comp-14*53 de las fusiones *putA::sfGFP* y *alr2431::sfGFP* respectivamente, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsiR3, la versión Mut-14 de NsiR3, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300). Se adquirieron datos de 50.000 células por muestra.**

Los resultados obtenidos confirman la interacción entre NsiR3 y la región 5'UTR de los mRNAs de *putA* y *alr2431*. Al objeto de comprobar si dichas interacciones están conservadas en la mayoría de las cianobacterias que contienen NsiR3, se realizó una predicción con el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) para cada uno de los organismos de la Figura 3.2. Al analizar los datos obtenidos se observó que las interacciones predichas por el algoritmo IntaRNA en *Nostoc* sp. PCC 7120 no estaban conservadas en el resto de cianobacterias. Estos resultados son congruentes con el hecho de que *putA* y *alr2431* no apareciesen en el análisis de CopraRNA, un acercamiento que tiene en cuenta, entre otros factores, la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas. Como ya se ha mencionado anteriormente, la identificación de estos mRNAs diana se basó únicamente en el análisis de la red de coexpresión disponible en el laboratorio.

3.1.5. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Para estudiar *in vivo* en *Nostoc* sp. PCC 7120 el posible efecto de NsiR3 sobre la expresión de *alr2431* se utilizó la estirpe $\Delta nsiR3$, y se generó una estirpe, $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$ (Tabla 2.1), en la que la expresión de NsiR3 está bajo el control del promotor de *petE*, un promotor inducible mediante la adición de cobre (Buikema y Haselkorn, 2001). De este modo, la transcripción de NsiR3 pasa a estar regulada por cobre, de forma independiente a la fuente de nitrógeno disponible. Para la generación de esta estirpe, se fusionó el promotor de *petE* a la secuencia que codifica NsiR3L mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, y el fragmento resultante se clonó en el plásmido replicativo pSAM221, generando el plásmido pIAE24 (Tabla 2.4), que se introdujo en la estirpe $\Delta nsiR3$ de *Nostoc* sp. PCC 7120 por conjugación (apartado 2.2.9.3).

Los datos de dRNA-Seq (Mitschke *et al.*, 2011b) indican que *alr2431* se transcribe a partir de un TSS cuya expresión se reprime aproximadamente un 50% en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado. Al objeto de analizar *in vivo* el posible efecto de NsiR3 sobre la regulación de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120, se comparó la acumulación del transcrito *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en las dos estirpes con niveles alterados de NsiR3, $\Delta nsiR3$ y $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$. Para ello, se analizó mediante Northern blot la expresión del transcrito *alr2431* en células de estas estirpes sometidas a distintos periodos de carencia de nitrógeno combinado (Figura 3.10). Para la realización de estos experimentos, a los cultivos de estas estirpes establecidos en amonio se les retiró el nitrógeno combinado del medio, situación en la que la transcripción del mRNA de *alr2431* se reprimiría en la estirpe silvestre. Simultáneamente se les añadió 1,5 μ M de $CuSO_4$, lo que induciría la expresión de NsiR3 a partir

del promotor de *petE* en la estirpe $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$. Los análisis de Northern blot realizados en la estirpe silvestre de *Nostoc* sp. PCC 7120 muestran la expresión de un transcrito de 1,5 kb cuya acumulación se reprime en ausencia de nitrógeno combinado, confirmando los datos de dRNA-Seq. Además, a diferencia de lo que ocurre en la estirpe silvestre, se observa que la acumulación del transcrito *alr2431* no se reprime en la estirpe $\Delta nsiR3$ cuando se retira el nitrógeno combinado del medio, permaneciendo en unos niveles similares a los existentes en presencia de nitrógeno combinado. Sin embargo, la acumulación del transcrito *alr2431* sí se reduce fuertemente en la estirpe $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$, en la que NsiR3 se expresa a partir del promotor de *petE*. Estos resultados sugieren que NsiR3 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120.

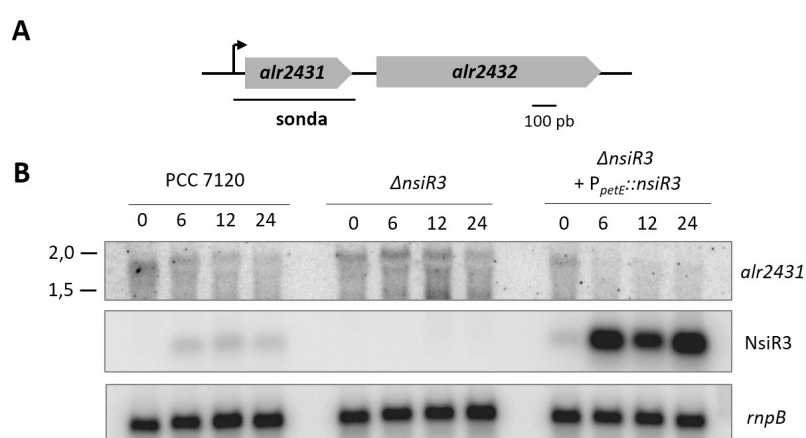


Figura 3.10. Identificación mediante Northern blot del transcrito de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y efecto de NsiR3 sobre la acumulación del mismo. (A) Representación esquemática del operón formado por los genes *alr2431-alr2432* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Se indica con una barra negra la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot. La posición del TSS de *alr2431* definido en (Mitschke *et al.*, 2011b) se representa con una flecha negra. (B) Efecto de NsiR3 sobre la acumulación del transcrito de *alr2431* en estirpes con niveles alterados de NsiR3. Northern blot con 8,5 μ g de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes $\Delta nsiR3$ y $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$. Las células se cultivaron en presencia de amonio en un medio en ausencia de cobre (0), para evitar la expresión del promotor de *petE*, y posteriormente se transfirieron a un medio sin nitrógeno combinado al que se añadió 1,5 μ M de $CuSO_4$, recogiendo muestras para su análisis tras el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito de *alr2431*. Se utilizó como sonda un fragmento de 499 nt obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 649 y 802. Los marcadores de tamaño (en kb) están indicados a la izquierda. El panel central muestra la expresión del transcrito NsiR3 en la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 403 nt (Figura 3.1) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 125 y 126. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. Se muestra un experimento representativo.

3.1.6. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Los datos de dRNA-Seq (Mitschke *et al.*, 2011b) indican que *putA* se expresa a partir de dos TSS muy próximos, separados sólo 15 nucleótidos, cuya transcripción se reprime en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado. Los análisis de Northern blot realizados con la estirpe silvestre de *Nostoc* sp. PCC 7120 muestran una represión transitoria del transcrito de

putA durante las primeras horas de exposición a la situación de carencia de nitrógeno combinado, mientras tiene lugar la diferenciación de los heterocistos (Figura 3.11). Una vez diferenciados, los heterocistos maduros comienzan a fijar nitrógeno atmosférico, por lo que la deficiencia de nitrógeno combinado se revierte en torno a las 24 horas, apreciándose una recuperación parcial del nivel de expresión de *putA*. Además, se observa que la dinámica de expresión del transcrito *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120 en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado es complementaria a la observada para NsiR3. Esta observación sería consistente con la implicación de NsiR3 en la regulación de *putA*.

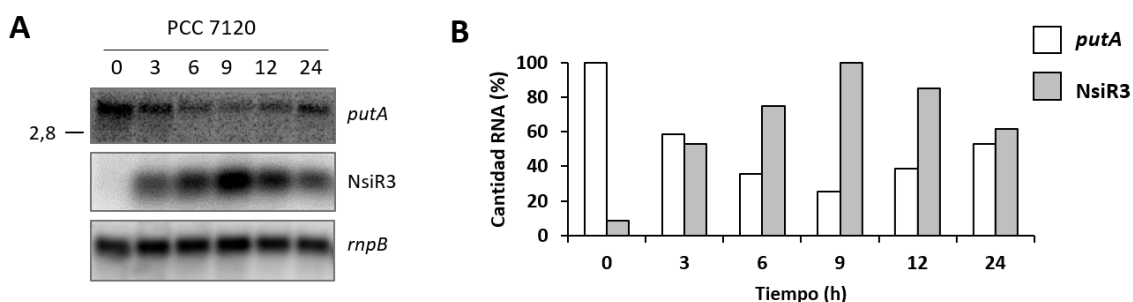


Figura 3.11. (A) Análisis de la regulación del transcrito de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Northern blot con 8 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 cultivadas en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidas a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito de *putA*. Se utilizó como sonda un fragmento de 122 nt obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 645 y 646. La posición del rRNA 23S (2,8 kb) se indica a la izquierda. El panel central muestra la expresión del transcrito NsiR3 en la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 403 nt (Figura 3.1) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 125 y 126. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. **(B) Cuantificación de la acumulación de los transcritos de *putA* y *nsrR3*.** Se representa la cantidad de cada transcrito normalizada por la cantidad de *rnpB* como porcentaje del máximo. Se muestra un experimento representativo.

Al objeto de analizar *in vivo* el posible efecto de NsiR3 sobre la regulación de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120, se comparó la acumulación del transcrito *putA* en las dos estirpes con niveles alterados de NsiR3, $\Delta nsiR3$ y $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$. Para ello, se analizó mediante Northern blot la expresión del transcrito *putA* en células de estas estirpes sometidas a distintos periodos de carencia de nitrógeno combinado (Figura 3.12). Para la realización de estos experimentos, a los cultivos de estas estirpes establecidos en amonio se les retiró el nitrógeno combinado del medio, situación en la que la transcripción del mRNA de *putA* se reprime. Simultáneamente se les añadió 1,5 µM de CuSO₄ para inducir la expresión de NsiR3 a partir del promotor de *petE* en la estirpe $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$.

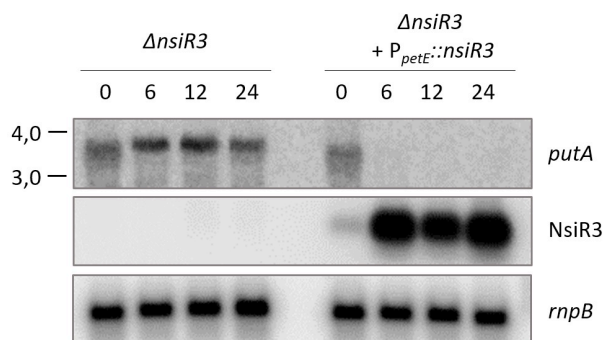


Figura 3.12. Efecto de NsiR3 sobre la acumulación del transcrito de *putA* en estirpes con niveles alterados de NsiR3. Northern blot con 8,5 μ g de RNA total procedente de células de las estirpes $\Delta nsiR3$ y $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$. Las células se cultivaron en presencia de amonio en un medio en ausencia de cobre (0), para evitar la expresión del promotor de *petE*, y posteriormente se transfirieron a un medio sin nitrógeno combinado al que se añadió 1,5 μ M de $CuSO_4$, recogiendo muestras para su análisis tras el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito de *putA*. Se utilizó como sonda un fragmento de 122 nt obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 645 y 646. Los marcadores de tamaño (en kb) están indicados a la izquierda. El panel central muestra la expresión del transcrito NsiR3 en la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 403 nt (Figura 3.1) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 125 y 126. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. Se muestra un experimento representativo.

Se observa que la acumulación del transcrito *putA*, a diferencia de lo que ocurre en la estirpe silvestre, no se reprime en la estirpe $\Delta nsiR3$ cuando se retira el nitrógeno combinado del medio, permaneciendo en unos niveles similares a los existentes en presencia de nitrógeno combinado. Sin embargo, la acumulación del transcrito *putA* sí se reduce fuertemente en la estirpe $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$, que expresa NsiR3 a partir del promotor de *petE*. Estos resultados sugieren que NsiR3 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120.

3.2. CAPÍTULO II

NsrR1, un sRNA cuya expresión se reprime en condiciones de carencia de nitrógeno combinado

3.2. NsrR1, un sRNA cuya expresión se reprime en condiciones de carencia de nitrógeno combinado

3.2.1. Identificación de NsrR1 en *Nostoc* sp. PCC 7120

En el estudio de los datos proporcionados por el análisis de dRNA-Seq (Mitschke *et al.*, 2011b), se identificó un TSS (*Transcription Start Site*) en la posición 2050703f del cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 que corresponde a un transcrito que se reprime significativamente en ausencia de nitrógeno combinado. Este TSS se encuentra situado en la región intergénica, de 710 pb, comprendida entre dos marcos abiertos de lectura anotados, *alr1709* y *all1710*. Asimismo, en otro experimento de RNA-Seq disponible en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Flaherty *et al.*, 2011), también se observó una transcripción regulada por nitrógeno en esta región. Además, en el acercamiento realizado en nuestro laboratorio para la identificación global de sRNAs conservados filogenéticamente en cianobacterias (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), se predijo un sRNA que se transcribiría desde el TSS en la posición 2050703f hasta un terminador independiente de Rho en la posición 2050814f (Ionescu *et al.*, 2010). En base a los datos de expresión disponibles en (Mitschke *et al.*, 2011b), hemos denominado a este posible sRNA NsrR1 (*nitrogen stress-repressed RNA 1*). En la Figura 3.13 se muestra una representación esquemática de *nsrR1* y su entorno genómico.

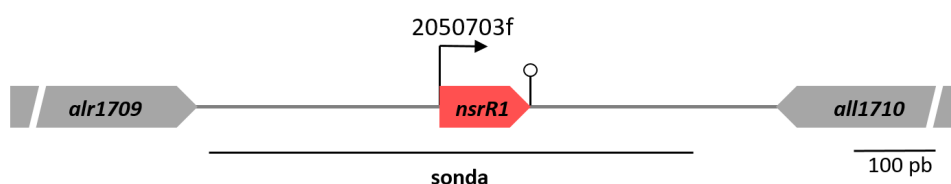


Figura 3.13. Representación esquemática de la región que codifica NsrR1 en *Nostoc* sp. PCC 7120. Se indican en gris los dos marcos de lectura abiertos que flanquean *nsrR1* (en rojo), junto con la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot. La flecha negra representa el inicio de la transcripción en la posición 2050703f (Mitschke *et al.*, 2011b). El lazo indica el posible terminador transcripcional de *nsrR1*.

El análisis filogenético reveló que las secuencias que codifican homólogos de NsrR1 están conservadas en todos los genomas de las cianobacterias formadoras de heterocistos analizadas en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), así como en dos estirpes unicelulares muy cercanas filogenéticamente a ellas, pero no en estirpes más alejadas en el árbol filogenético. El alineamiento de estas secuencias (Figura 3.14) permite la identificación de un posible terminador transcripcional independiente de Rho en todas las estirpes estudiadas, sugiriendo la transcripción de un sRNA filogenéticamente conservado.

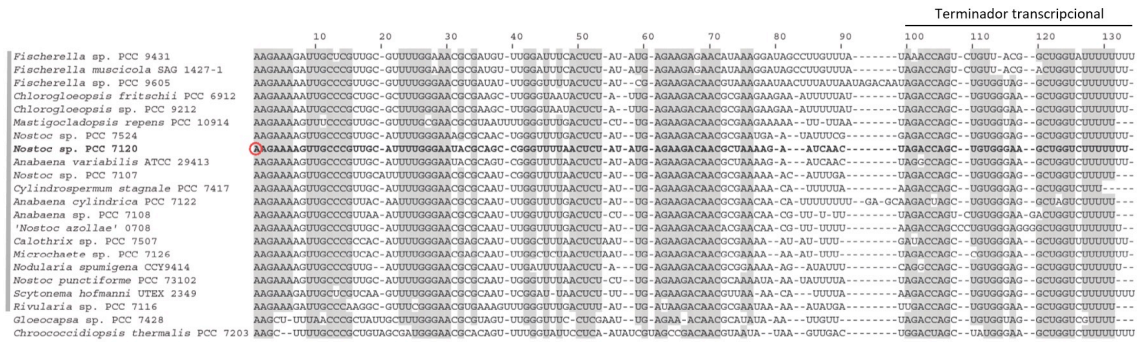


Figura 3.14. Alineamiento de los homólogos de NsrR1 identificados en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). La secuencia de *Nostoc* sp. PCC 7120 se muestra en negrita. Los nucleótidos sombreados indican una conservación de más del 90% de la secuencia. El TSS verificado en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b) aparece marcado con un círculo rojo. El posible lazo terminador conservado aparece señalado con una barra negra. Las estirpes formadoras de heterocistos se señalan con una barra gris a la izquierda.

Teniendo en cuenta toda esta información, y al objeto de verificar experimentalmente la transcripción de NsrR1, se realizó un Northern blot (Figura 3.15) con RNA extraído de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes *ntcA* (CSE2) y *hetR* (216), cultivadas en presencia de amonio o en ausencia de nitrógeno combinado durante distintos periodos de tiempo.

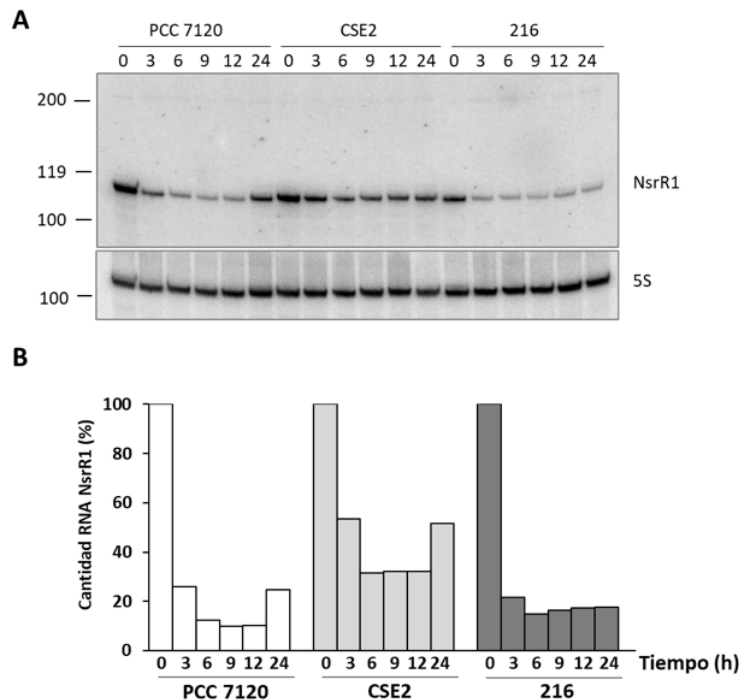


Figura 3.15. Análisis de la expresión de NsrR1 en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes CSE2 y 216. (A) Northern blot con 5 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes *ntcA* (CSE2) y *hetR* (216) cultivadas en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidas a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito NsrR1. Se utilizó como sonda un fragmento de 639 nt (Figura 3.13) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 158 y 159. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con una sonda complementaria al RNA 5S (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en nt). (B) Cuantificación de la acumulación del transcrito NsrR1. Se representa la cantidad de transcrito *nsrR1* en función del máximo para cada estirpe normalizada por la cantidad de RNA 5S en unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra un experimento representativo.

Se observa la expresión de un transcrito de aproximadamente 110 nucleótidos, que correspondería a *NsrR1*, cuya transcripción se reprime en condiciones de carencia de nitrógeno combinado. Esta represión es significativamente menor en la estirpe mutante *ntcA* (CSE2), lo que sugiere que la represión transcripcional de *NsrR1* en estas condiciones está mediada, al menos en parte, por *NtcA*. En la estirpe silvestre, tras 24 horas en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, una situación en la que la deficiencia de nitrógeno se revierte dado que los heterocistos ya se han diferenciado y están fijando nitrógeno atmosférico, la transcripción de *NsrR1* se recupera parcialmente. En la estirpe *hetR* (216) la represión de *NsrR1*, similar a la observada en la estirpe silvestre se mantiene a las 24 h. En esta estirpe, incapaz de diferenciar heterocistos y fijar nitrógeno atmosférico, la deficiencia en nitrógeno se mantiene a las 24 horas.

La transcripción de *NsrR1* se analizó también tras la adición de amonio a células de cultivos establecidos creciendo a expensas de nitrato o de nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno (Figura 3.16). En ambos casos, la adición de amonio provoca un aumento de los niveles de *NsrR1* a lo largo del tiempo, aunque este aumento ocurre antes en las células que estaban creciendo previamente en presencia de nitrato, que en las células que estaban creciendo a expensas de nitrógeno atmosférico.

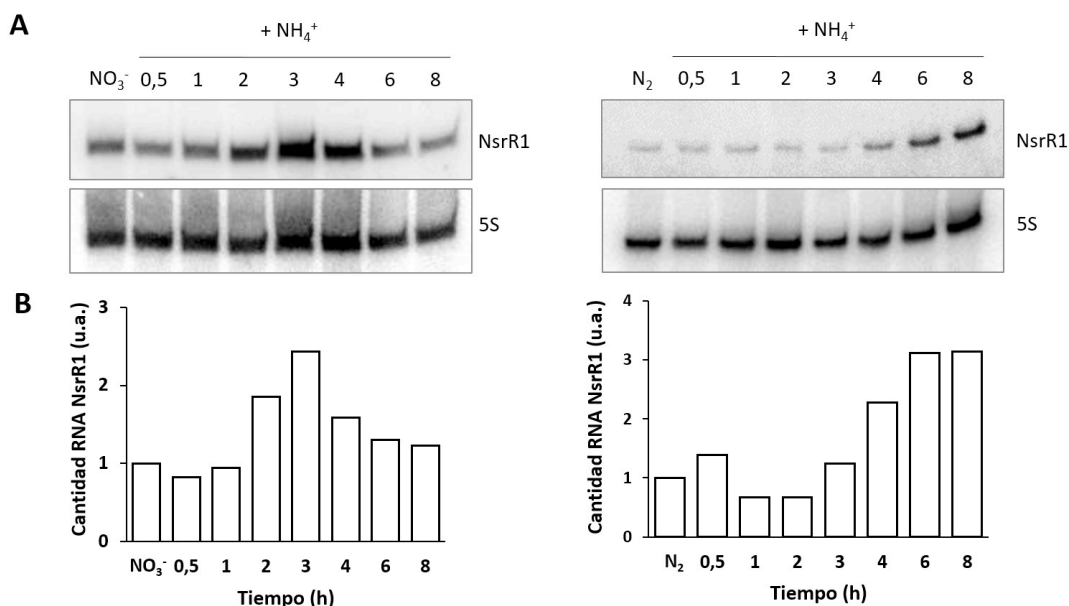


Figura 3.16. Análisis de la expresión de *NsrR1* en *Nostoc* sp. PCC 7120 tras la adición de amonio. (A) Northern blot con 5 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 creciendo a expensas de nitrato (izquierda) o de nitrógeno atmosférico (derecha), y posteriormente cultivadas durante el número de horas indicado tras la adición de 10 mM de NH₄Cl y 20 mM TES-NaOH (pH 7,5) al medio. Los paneles superiores muestran la expresión del transcrito *NsrR1*. Se utilizó como sonda un fragmento de 639 nt (Figura 3.13) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 158 y 159. Los paneles inferiores muestran la hibridación de las mismas membranas con una sonda complementaria al RNA 5S (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. **(B) Cuantificación de la acumulación del transcrito *NsrR1*.** Se representa la cantidad de transcrito *NsrR1* normalizada por la cantidad de RNA 5S en unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra en cada caso un experimento representativo.

3.2.2. Regulación de la expresión de *nsrR1* por NtcA

Los datos que se muestran en la Figura 3.15 sugieren la participación de NtcA en la regulación de la expresión de NsrR1. Como se ha mencionado anteriormente, los promotores que responden a la disponibilidad de nitrógeno en las cianobacterias están comúnmente regulados de forma directa a través de la unión de NtcA a secuencias específicas conservadas en los mismos. Se ha comparado (Figura 3.17) la secuencia del promotor de NsrR1 de *Nostoc* sp. PCC 7120 con las secuencias promotoras de los homólogos de NsrR1 identificados (Figura 3.14). En todos los promotores de los genomas analizados se encontró un posible motivo de unión de NtcA (GTN₁₀AC) conservado (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014; Giner-Lamia *et al.*, 2017), que en este promotor en concreto corresponde a GTRN₈TAC. Este posible motivo de unión de NtcA conservado solaparía parcialmente con la caja -10, una posición descrita como compatible para que NtcA actúe como un represor directo de la transcripción de NsrR1 mediante su unión a estas secuencias (Mitschke *et al.*, 2011; Picossi *et al.*, 2014).

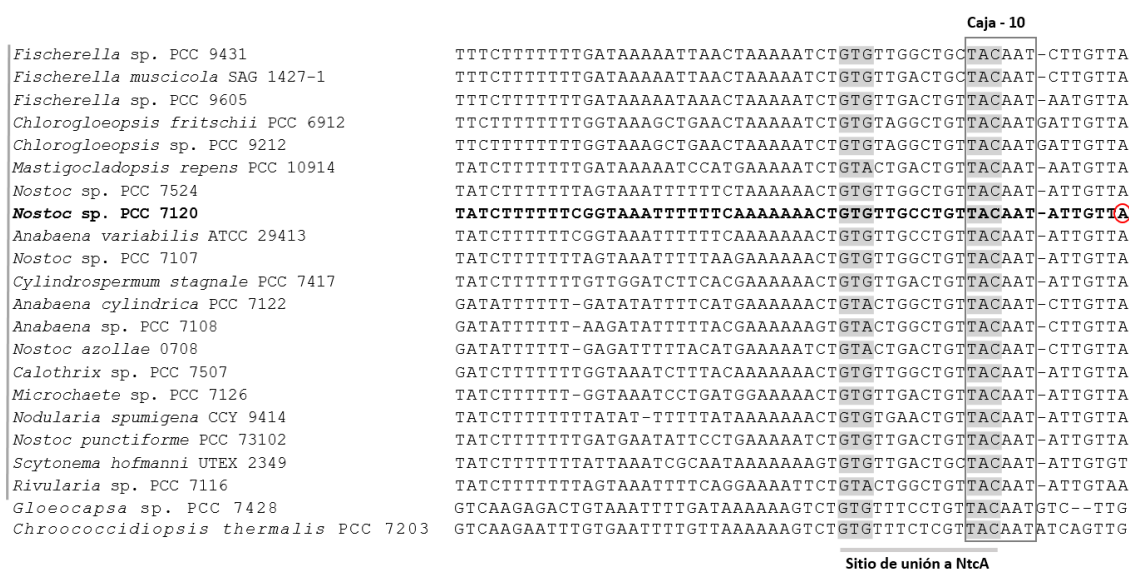


Figura 3.17. Comparación de las secuencias promotoras de los homólogos de NsrR1 identificados en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). La secuencia de *Nostoc* sp. PCC 7120 se muestra en negrita. El TSS verificado en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b) aparece marcado con un círculo rojo. Se resaltan en gris los posibles sitios de unión de NtcA. La posible caja -10 se enmarca en un recuadro. Las estirpes formadoras de heterocistos se señalan con una barra gris a la izquierda.

La observación de que tanto la secuencia de NsrR1 como la presencia de un posible sitio de unión de NtcA en su región promotora estén filogenéticamente conservados en los genomas de las cianobacterias formadoras de heterocistos, así como en dos estirpes unicelulares muy cercanas filogenéticamente a ellas, sugiere que NsrR1 es un sRNA funcional relacionado con la respuesta al estrés nutricional por carencia nitrógeno en este grupo de cianobacterias.

Al objeto de verificar la posible interacción entre NtcA y la región promotora de *NsrR1*, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética con proteína NtcA purificada, y un fragmento de DNA, que se extiende desde -239 a +50 con respecto al TSS de *nsrR1*, que incluye la posible secuencia de unión de NtcA. Como se observa en la Figura 3.18, en presencia de proteína NtcA se produce un retardo del fragmento de DNA que contiene la secuencia promotora de *nsrR1*. Sin embargo, no se observa retardo cuando el ensayo se realiza con un fragmento de DNA que contiene una versión del promotor de *nsrR1* con el posible sitio de unión de NtcA mutado (TAC se cambió a ATG). La mutagénesis se realizó mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 183 y 153, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 418 y 419 (Tabla 2.5). Estos resultados demuestran la unión de NtcA a una secuencia específica del promotor de *nsrR1* que solapa con la caja -10. Estas observaciones son compatibles con la represión directa de la transcripción del promotor de *nsrR1* por NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, aunque como ya se ha comentado, debe haber algún otro elemento implicado, responsable de la represión parcial que se observa en la estirpe mutante *ntcA* (CSE2) (véase Figura 3.15).

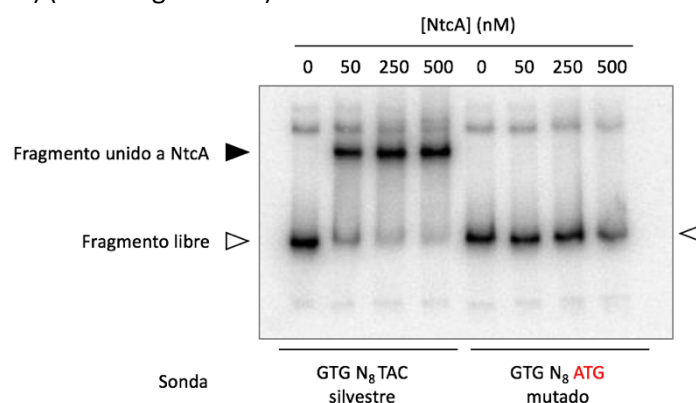


Figura 3.18. Unión de la proteína NtcA a la región promotora de NsrR1. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética con proteína NtcA purificada. Se utilizó como sonda un fragmento de DNA de 289 pb, obtenido por PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 183 y 153, que contiene el promotor de *NsrR1* de *Nostoc* sp. PCC 7120, marcado en el extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP. En la mitad izquierda se muestra el experimento realizado con la versión silvestre del promotor. En la mitad derecha se muestra el experimento realizado con una versión mutada del promotor, alterada en las posiciones señaladas en rojo. La posición de los fragmentos de DNA retardados se indica con un triángulo negro, mientras que los fragmentos libres se indican con triángulos vacíos.

3.2.3. Selección de posibles mRNAs diana de NsrR1

Para identificar posibles mRNAs regulados por *NsrR1* se utilizó el algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014). Para la predicción se utilizó como referencia la secuencia de *NsrR1* de *Nostoc* sp. PCC 7120, junto con las secuencias de *NsrR1* de *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc azollae* 0708, *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Rivularia* sp. PCC 7116 y *Calothrix* sp. PCC 7507.

En la Tabla 3.4 se presenta una lista de los genes con mayor puntuación predichos por CopraRNA como posibles candidatos a interactuar con NsrR1. A partir de esta lista, se seleccionaron para su estudio el gen *all1871*, que codifica una proteína de función desconocida, pero que aparece como el mejor candidato a interactuar con NsrR1, así como el grupo de genes formado por *asr4517* (*nblA*), *alr3684* (*clpX*), *asl4325* (*clpS*) y *alr1238* (*clpP*), cuya función está relacionada con el proceso de degradación de los ficobilisomas, un mecanismo implicado en la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno combinado.

Tabla 3.4. mRNAs candidatos a interactuar con NsrR1 según la predicción de CopraRNA.

Posición	p-value	Gen	Anotación
1	6,09x10⁻⁰⁷	<i>all1871</i>	
2	1,79x10 ⁻⁰⁵	<i>all1043</i>	
3	3,46x10 ⁻⁰⁵	<i>alr0309</i>	
4	6,17x10 ⁻⁰⁵	<i>asl4014</i>	
5	1,01x10 ⁻⁰⁴	<i>all4613</i>	Subunidad catalítica de la acetolactato sintasa 3
6	1,82x10⁻⁰⁴	<i>asr4517</i>	NblA; degradación de los ficobilisomas
7	2,34x10 ⁻⁰⁴	<i>all1395</i>	
8	3,60x10⁻⁰⁴	<i>alr3684</i>	ClpX; proteasa Clp dependiente de ATP; subunidad de unión a ATP
9	8,50x10 ⁻⁰⁴	<i>alr4814</i>	
10	8,76x10 ⁻⁰⁴	<i>alr4380</i>	Deshidratasa del ácido Δ-aminolevulínico
11	9,13x10 ⁻⁰⁴	<i>all4102</i>	
12	1,01x10 ⁻⁰³	<i>all1043</i>	
13	1,07x10 ⁻⁰³	<i>alr3594</i>	Regulador de respuesta de dos componentes
14	1,23x10 ⁻⁰³	<i>alr0972</i>	Transportador ABC, proteína de unión a ATP
15	1,26x10 ⁻⁰³	<i>alr1302</i>	Acetiltransferasa
16	1,59x10 ⁻⁰³	<i>all7598</i>	
17	1,78x10 ⁻⁰³	<i>alr1462</i>	Escisión del elemento fdxN
18	1,99x10 ⁻⁰³	<i>alr3099</i>	
19	2,24x10⁻⁰³	<i>asl4325</i>	ClpS; proteasa Clp dependiente de ATP; proteína adaptadora
20	2,32x10 ⁻⁰³	<i>alr1808</i>	
66	1,08x10⁻⁰²	<i>alr1238</i>	ClpP; proteasa Clp dependiente de ATP; subunidad proteolítica

Se muestran genes predichos por el algoritmo CopraRNA como posibles mRNAs diana de NsrR1 con mayor puntuación. El algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014) está implementado en el servidor de Freiburg RNA Tools (apartado 2.10). Para el análisis se utilizó como referencia la secuencia de NsrR1 de *Nostoc* sp. PCC 7120, junto con las secuencias de NsrR1 de *Anabaena cylindrica* PCC 7122, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc azollae* 0708, *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Rivularia* sp. PCC 7116 y *Calothrix* sp. PCC 7507. Aparecen resaltados en negrita aquellos genes que se han analizado en este trabajo.

Para cada uno de estos genes se llevó a cabo la predicción de la interacción de sus mRNAs con NsrR1 mediante IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) (Figura 3.19). En todos los casos, a excepción de *asl4325*, la zona de la posible interacción predicha por este algoritmo está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen NsrR1, y tendría lugar en la región 5'UTR (UTR, “*Untranslated región*”) de los mRNAs diana. En el caso concreto del mRNA de *asl4325*, la interacción predicha tendría lugar en la región codificante, 30 nucleótidos tras el codón de inicio de la traducción. La observación de que las interacciones predichas estén conservadas y tengan lugar en las regiones 5'UTR de los mRNAs diana, o en la zona codificante pero muy cerca del inicio de la traducción, sugiere que dichos mRNAs podrían estar sometidos a una regulación postranscripcional por NsrR1.

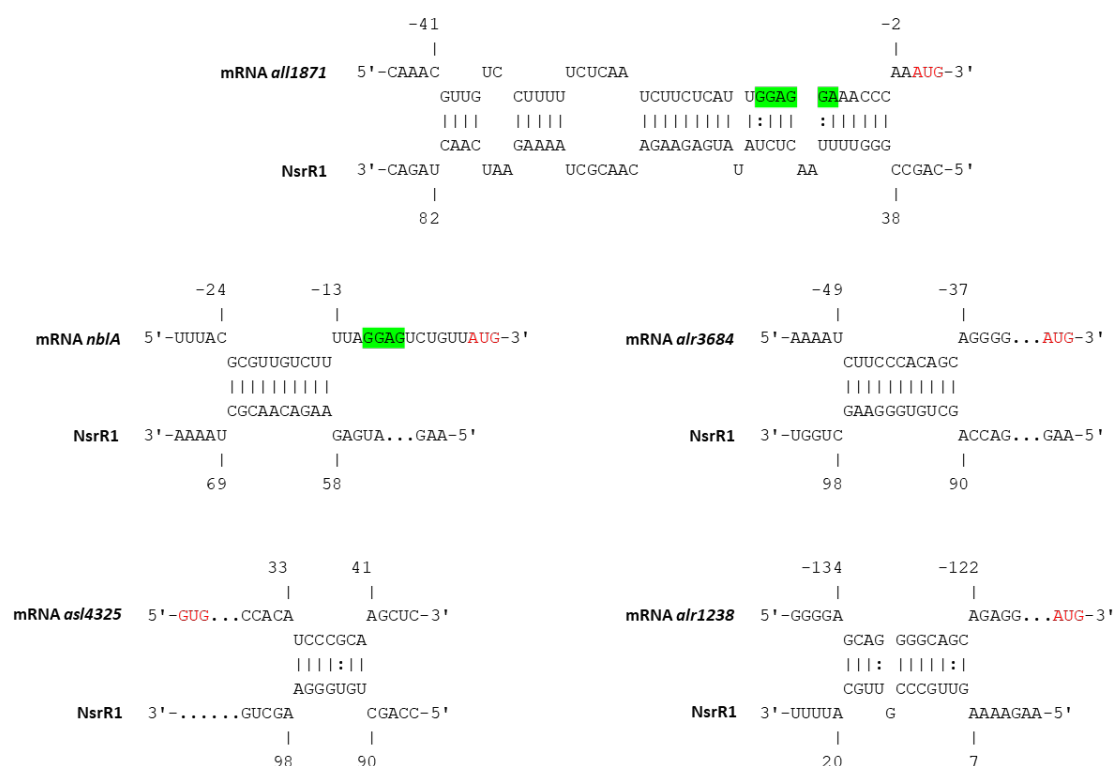


Figura 3.19. Interacciones entre NsrR1 y los mRNAs diana seleccionados para su estudio. Las interacciones que se muestran derivan de la aplicación del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), que está implementado en el servidor de Freiburg RNA Tools (apartado 2.10). Al objeto de limitar la búsqueda a interacciones específicas en la región cercana al codón de inicio de los mRNAs diana, la predicción se realizó con la secuencia completa de NsrR1 y la región comprendida entre -200 y +100 de los mRNA diana. Los nucleótidos de los mRNAs diana se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG, GUG en el caso de *asl4325*, aparece señalado en rojo, y las posibles secuencias Shine-Dalgarno resaltadas en verde.

3.2.4. Validación de la interacción entre NsrR1 y los mRNAs seleccionados

Para verificar la interacción entre NsrR1 y los mRNAs seleccionados se usó de nuevo el sistema heterólogo implementado en *E. coli* descrito en el apartado 2.6. En el caso de *asl4325*, que tiene GTG como codón de inicio de la traducción, y al objeto de mejorar la eficiencia de la traducción en *E. coli*, el codón de inicio GTG se reemplazó por ATG mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2. La Tabla 3.5 muestra la información relativa a las construcciones utilizadas para la validación en *E. coli* de la interacción de NsrR1 con los mRNAs seleccionados como posibles dianas.

La estrategia de clonación seguida para insertar la región 5'UTR de los mRNAs en los plásmidos pXG-10-SF o pXG-30-SF fue similar a la descrita en el apartado 2.6. Sin embargo, cabe resaltar que la secuencia de *all1871* utilizada, comprendida entre el TSS, situado a 137 nucleótidos aguas arriba del inicio de la traducción, y los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante, contiene dos sitios NheI. Por este motivo, hubo que modificar ligeramente la estrategia habitual. En este caso en particular, para la amplificación de esta secuencia, el cebador situado aguas abajo incluía un sitio XbaI, que es compatible con NheI. Así se hace posible la ligación de este inserto, con el sitio XbaI, en el sitio NheI del plásmido pXG-10-SF. Por su parte, el gen *nbIA* se transcribe desde cinco TSS validados mediante análisis de extensión del cebador (Mitschke *et al.*, 2011b). Para la fusión de la región 5'UTR de este mRNA con el gen *sfgfp* de pXG-10-SF se eligió el TSS más próximo al codón de inicio de la traducción, situado 106 nucleótidos aguas arriba del mismo.

Tabla 3.5. Secuencias de los insertos clonados para la validación, mediante el sistema heterólogo en *E. coli*, de la interacción entre NsrR1 y los mRNAs seleccionados como posibles dianas.

Gen	TSS	Secuencia clonada	Plásmido	Plásmido resultante
<i>all1871</i>	-137	atgcaT [■] CCCTGCTA [■] ACCCAGGGGGAAAG [■] GCTAGC [■] CA ACAAAA [■] GCTAGC [■] AGTTACGAGAAAAAAGCCGCTCCCA CATTATGCGCGGCTTCCCTGAAAACAAACGTTGTCCT TTTTCTCAATCTTCTCATTGGAGGAAACCCAAATGTC [■] TCACTTTAGCACTCTCCGCACCAAAATCACCGATGCC GAAATCCTCAAAGCTTCC [■] tctagc [■]	pXG-10-SF	pIAE9
<i>asr4517</i> (<i>nblA</i>)	-106	atgcaT [■] ACAGAGGAATAATCAACAATATGGGGCAGGT ACTAACTAAAGTCCTATGCCTGTGGGGCTTCTGTAAC CGACATAACCTTTACGCGTTGTCTTTTAGGAGTCTGT TATGAACCAACCAATCGAATTGTCATTAGAACAACAA TTCAGCATTCGCTCATTGGCCACC [■] gctagc [■]	pXG-10-SF	pIAE11
<i>alr3684</i>	-	atgcaT [■] CAAGTCATCTCCAGACAAAATCTTCCCACAG CAGGGGAAAAACGTCACCATCGTGAAATAAGAGGCTGG TATGTCTAAGTACGACTCCCATTTAAATGTTCTTTTC TGTGGCAAGTCTCAAGAGCAGGTg [■] gctagc [■]	pXG-30-SF	pIAE18
<i>asl4325</i>	-47	atgcat [■] TACAGAGCCTGTGTTGTAGTA [■] ACTCCAAAA ACCAAGAGCAAAAGCT [■] ATGTCAGTCGAAACCATTGAG AAGCGTTCCACATCCCGCAAGCTCGCGCCTCGGTATC GC [■] gctagc [■]	pXG-10-SF	pIAE10
<i>alr1238</i>	-398	atgcaT [■] TTCAGGATGCAGAACTGATTTAGGTCAAGA TGGTATTCCGTCCACATTTGGCGACGGCATTCCGCCC ACCGTAGGCGATCGCCAAGCTACATAATTGAATAGCG AGCCTGAAAAATCAGGTGGGCAATTGTCAATAAAGGTT GATTTTCTTTCTCTAACTAGAAGAGCCATTTCTCTA GACGCATCTCACTATCAAAAGTGCCAAGAGGATGATG TGCATCTGCACTAGGAGGGACTGGGGACTGGGGACTG GGGATTGGGGGAGCAGGGGCAGCAGAGGAAGCAGGGG AAACAGGGGAAACAGGGAGTAAATGTCATTCCCAATA CCCAATACCCAAATACCCAATACCCAATACCCAATTGA TAAGATGGATGTAAATTAGCTACAAGCACGCTGCATG ACTATTCCTATCGTTATTGAACAATCAGGTCGAGGCG AACGCGCCTTTGATATTTAC [■] GCTAGC [■]	pXG-10-SF	pIAE13
<i>nsrR1</i>	-	[■] AGAAAAGTTGCCCGTTGCATTTTGGGAATACGCAGC CGGGTTTTAACTCTATATGAGAAGACAACGCTAAAAG AATCAACTAGACCAGCTGTGGGAAGCTGGTCTTTTTT TCCGTACATACAGTTTGACCAATAGTCGTTTTACGT GGTGCTCTGTCTAGA [■]	pZE12-luc	pAVN1

Se indica la posición del TSS (resaltado en rojo) identificado en (Mitschke *et al.*, 2011b), numerado con respecto al inicio de traducción, desde el que se realizan las fusiones de la región 5'UTR de los mRNAs con el gen *sfgfp* en pXG-10-SF. Nótese que las fusiones correspondientes a transcritos policistrónicos en el plásmido pXG-30-SF no se realizan desde el TSS, sino desde una posición situada 60 nucleótidos dentro del gen anterior (véase apartado 2.6). Las secuencias pertenecientes al cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 están en mayúscula. En negro se indican los nucleótidos de la secuencia que corresponden a la región 5'UTR del mRNA, mientras que en verde se señalan los primeros 60 nucleótidos de la secuencia codificante del mRNA. El nucleótido en rojo y subrayado indica la mutación puntual realizada en *asl4325* para reemplazar el codón de inicio de la traducción GTG por un codón ATG. Por su parte, en azul se indica la secuencia clonada en pZE12-luc, que contiene el gen *nsrR1*, resaltado en gris. Los sitios NsiI, NheI y XbaI se resaltan en celeste, amarillo y rosa respectivamente. Por último, se indica el plásmido en el que se clona cada inserto, así como el plásmido resultante generado (Tabla 2.4).

Al objeto de analizar la posible regulación ejercida por NsrR1 sobre los mRNAs seleccionados, se evaluaron los cambios en los niveles de proteína sfGFP de las células de *E. coli* que portaban diferentes combinaciones de estos plásmidos mediante fluorimetría (Figura 3.20A), tal y como se describe en el apartado 2.6, y mediante Western blot utilizando un anticuerpo frente a GFP (Figura 3.20B), tal y como se describe en el apartado 2.4.6. El plásmido pJV300 (Sittka *et al.*, 2007), que codifica un sRNA no relacionado, se usó como control. Se espera que la interacción entre NsrR1 y el mRNA que se esté analizando en cada caso produzca una alteración de los niveles de fluorescencia o de la acumulación de proteína sfGFP con respecto a las células control, portadoras de la fusión mRNA::sfGFP correspondiente y pJV300.

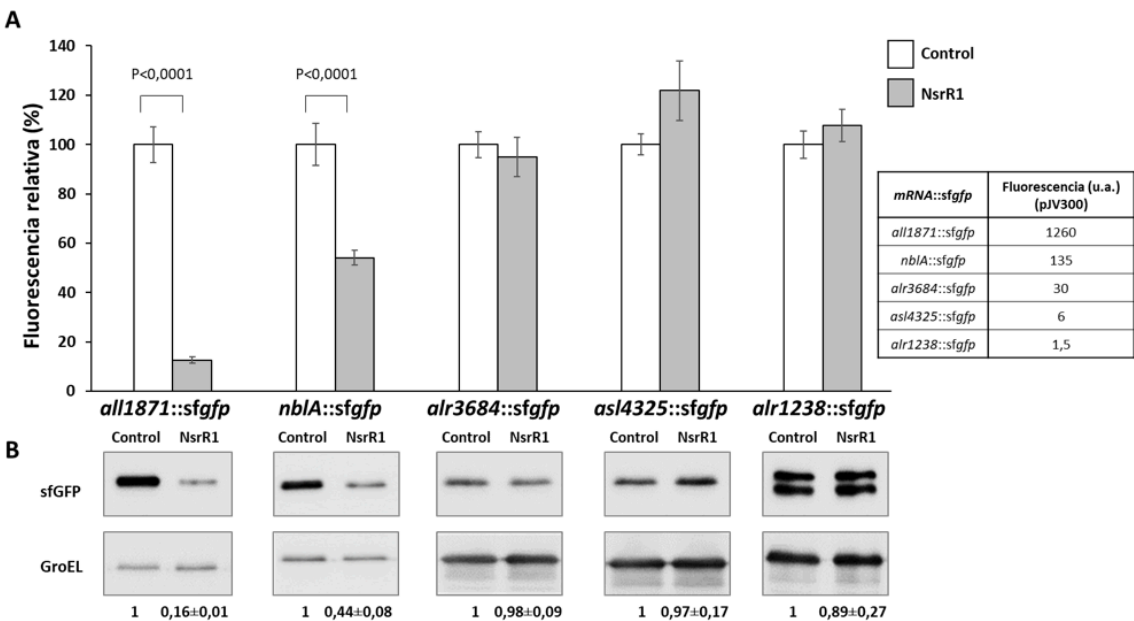


Figura 3.20. Verificación *in vivo* mediante un sistema heterólogo en *E. coli* de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de los mRNAs seleccionados. (A) Cuantificación de sfGFP mediante fluorescencia. Se representan los niveles de fluorescencia relativa de células de *E. coli* que portan un plásmido con la fusión mRNA::sfGFP combinado con el plásmido control pJV300, o con el plásmido pAVN1, que codifica NsrR1. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas de fluorescencia de ocho cultivos provenientes de colonias independientes. Para el cálculo de estos valores de fluorescencia se normalizó por la cantidad de células ($A_{600\text{ nm}}$), y se restaron los niveles de fluorescencia de células que portan pXG-0, un plásmido control sin sfGFP. La fluorescencia de las células portadoras de fusiones mRNA::sfGFP combinadas con el plásmido control pJV300 se considera en cada caso como 100%. Se indica el *p-value* correspondiente al test de *Student* en los casos en los que la diferencia de fluorescencia es significativa. La tabla muestra los valores de fluorescencia absolutos en unidades arbitrarias (u.a.) de las células que portan fusiones mRNA::sfGFP combinadas con el plásmido control pJV300. **(B) Cuantificación de sfGFP mediante Western blot.** Western blot de células de *E. coli* que portan un plásmido con la fusión mRNA::sfGFP combinado con el plásmido control pJV300, o con el plásmido pAVN1, que codifica NsrR1. El análisis se realizó con anticuerpos frente a GFP, o con anticuerpos comerciales frente a la proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los números en la parte inferior de la imagen indican los niveles relativos de sfGFP con respecto al control, después de la normalización con la señal para GroEL. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de cuatro cultivos provenientes de colonias independientes.

Como puede observarse, todas las fusiones traduccionales mRNA::sfgfp analizadas mediante Western blot mostraron unos niveles de proteína sfGFP detectables, lo que demuestra que la región del inicio de la traducción de estos mRNAs es funcional en *E. coli*. Sin embargo, sólo se observa una reducción significativa en los niveles de fluorescencia sfGFP, y en la cantidad de proteína sfGFP acumulada, en las células de *E. coli* en las que se expresa NsrR1 (pAVN1) en combinación con las fusiones traduccionales *all1871::sfgfp* (pIAE9) y *nblA::sfgfp* (pIAE11) (Tabla 2.4). La disminución de los niveles de fluorescencia de estas dos fusiones traduccionales en presencia de NsrR1 con respecto a las células control, que portan el plásmido pJV300, es de un 85% en el caso de *all1871* y de un 55% en el caso de *nblA*. Estos resultados sugieren una interacción directa entre NsrR1 y la región 5'UTR de estos dos mRNAs, que tendría como resultado en ambos casos una represión de su traducción.

3.2.5. Regulación ejercida por NsrR1 sobre el mRNA de *nblA*

3.2.5.1. Verificación de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *nblA*

Con el fin de verificar que la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *nblA* tiene lugar en la región predicha por IntaRNA (Figura 3.19), mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, se introdujeron mutaciones puntuales en la región de la secuencia de NsrR1 que se predice que está implicada en la interacción con el mRNA de *nblA*, y se realizaron además las correspondientes mutaciones compensatorias en la región 5'UTR de este mRNA. El método seguido para el diseño de estas mutaciones fue el mismo que el descrito en el apartado 3.1.4. Así, con el apoyo del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), se seleccionaron los nucleótidos de la secuencia de NsrR1 cuya mutación afectaría más drásticamente a la interacción predicha entre este sRNA y el mRNA de *nblA*, lo que se reflejaría en la supresión de la reducción en los niveles de fluorescencia observados. Igualmente, se llevaron a cabo mutaciones compensatorias en el mRNA, con las que se espera que la interacción se restablezca, produciéndose de nuevo una reducción en los niveles de fluorescencia.

Las predicciones realizadas con el algoritmo IntaRNA (Figura 3.19) sugieren que la posible región de NsrR1 que interacciona con la región 5'UTR de *nblA* está comprendida entre los nucleótidos 58-69. Teniendo en cuenta esta predicción, se introdujeron dos mutaciones puntuales, cambio de C a G, en los nucleótidos 63 y 66 de la secuencia de NsrR1 (Figura 3.21A). Las mutagénesis se realizaron mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 197 y 198, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 315 y 316, para la mutación en el nucleótido 63, y los oligonucleótidos 317 y 318 para la mutación en el nucleótido 66 (Tabla 2.5).

Estas versiones mutadas se denominaron Mut-63 y Mut-66 respectivamente, y los plásmidos que las contienen en lugar de la versión silvestre se denominaron pIAE26 (versión Mut-63) y pIAE27 (versión Mut-66) (Tabla 2.4). Además, se introdujeron las correspondientes mutaciones compensatorias, cambio de G a C, en los nucleótidos -18 y -21 de la región 5'UTR de *nblA* (Figura 3.21A). De nuevo, las mutagénesis se realizaron mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 253 y 254, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 329 y 330, para la mutación en el nucleótido -18, y los oligonucleótidos 331 y 332 para la mutación en el nucleótido -21 (Tabla 2.5). Estas versiones mutadas se denominaron Comp-63 y Comp-66 respectivamente, y los plásmidos que las contienen se denominaron pIAE28 (versión Comp-63) y pIAE29 (versión Comp-66) (Tabla 2.4).

Una vez realizadas estas mutaciones, se evaluaron los cambios en los niveles de fluorescencia de las células de *E. coli* que portaban diferentes combinaciones de estos plásmidos. Las medidas de fluorescencia de los cultivos líquidos de *E. coli* se llevaron a cabo mediante fluorimetría (Figura 3.21B), y mediante citometría de flujo (Figura 3.21C) según se describe en el apartado 2.6. Los niveles de fluorescencia de las células que portan la fusión a *sfgfp* de la 5'UTR silvestre de *nblA* combinada con una de las versiones mutadas de NsrR1, Mut-63 o Mut-66, son similares a los de las células portadoras de dicha fusión combinada con el plásmido pJV300 (control). Esta observación sugiere que la mutación de cualquiera de estos dos nucleótidos de NsrR1 reduce drásticamente la interacción entre este sRNA y la región 5'UTR de *nblA*. Además, cuando se combina cada una de las versiones mutadas de NsrR1 con las correspondientes fusiones portadoras de las mutaciones compensatorias en la región 5'UTR de *nblA*, se observa de nuevo una reducción significativa en los niveles de fluorescencia, similar a la obtenida con la combinación de los transcritos silvestres. Estos resultados confirman que la interacción de NsrR1 con la región 5'UTR del mRNA de *nblA* tiene lugar a través de los nucleótidos predichos por IntaRNA, así como el efecto de dicha interacción sobre la traducción de la proteína NblA.

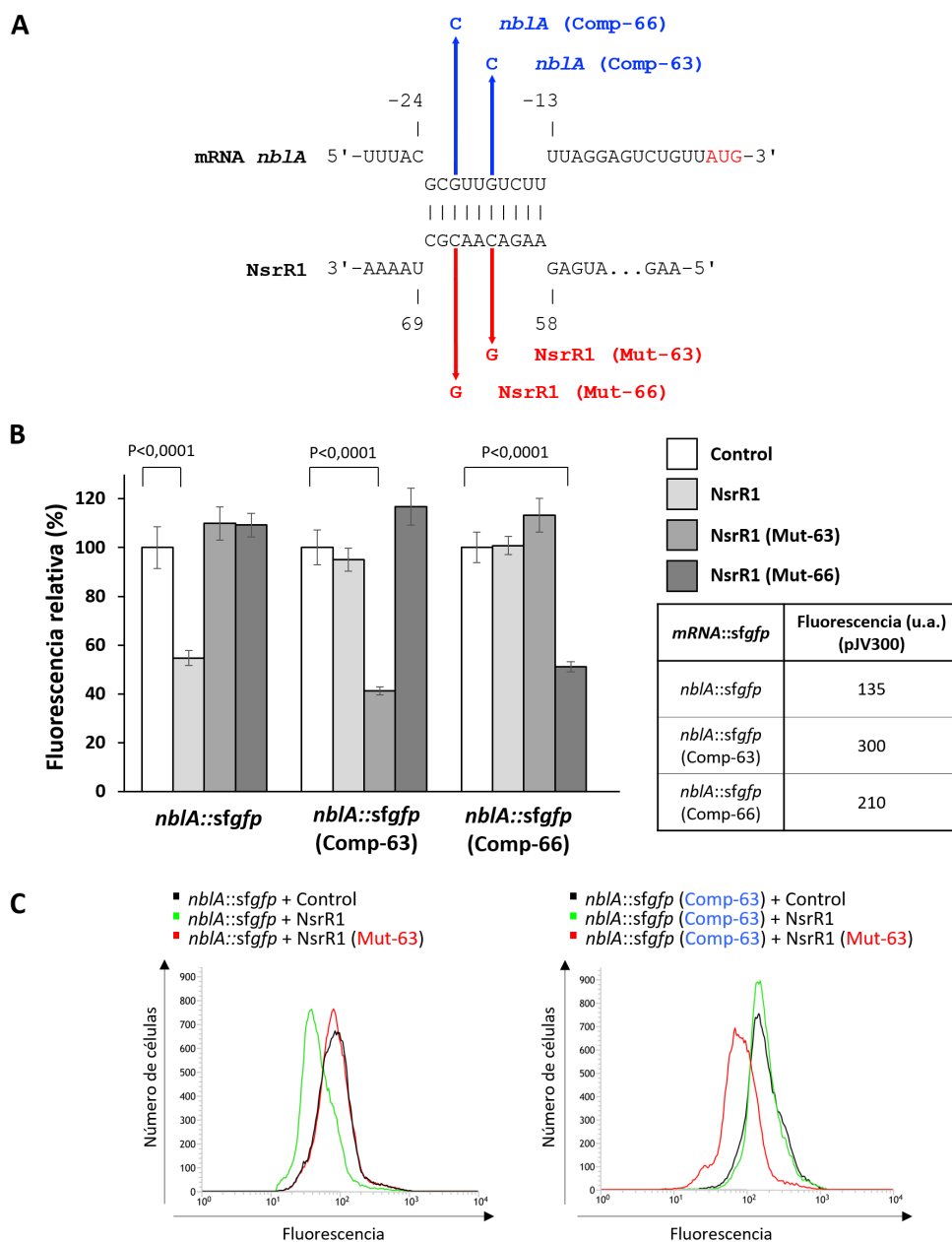
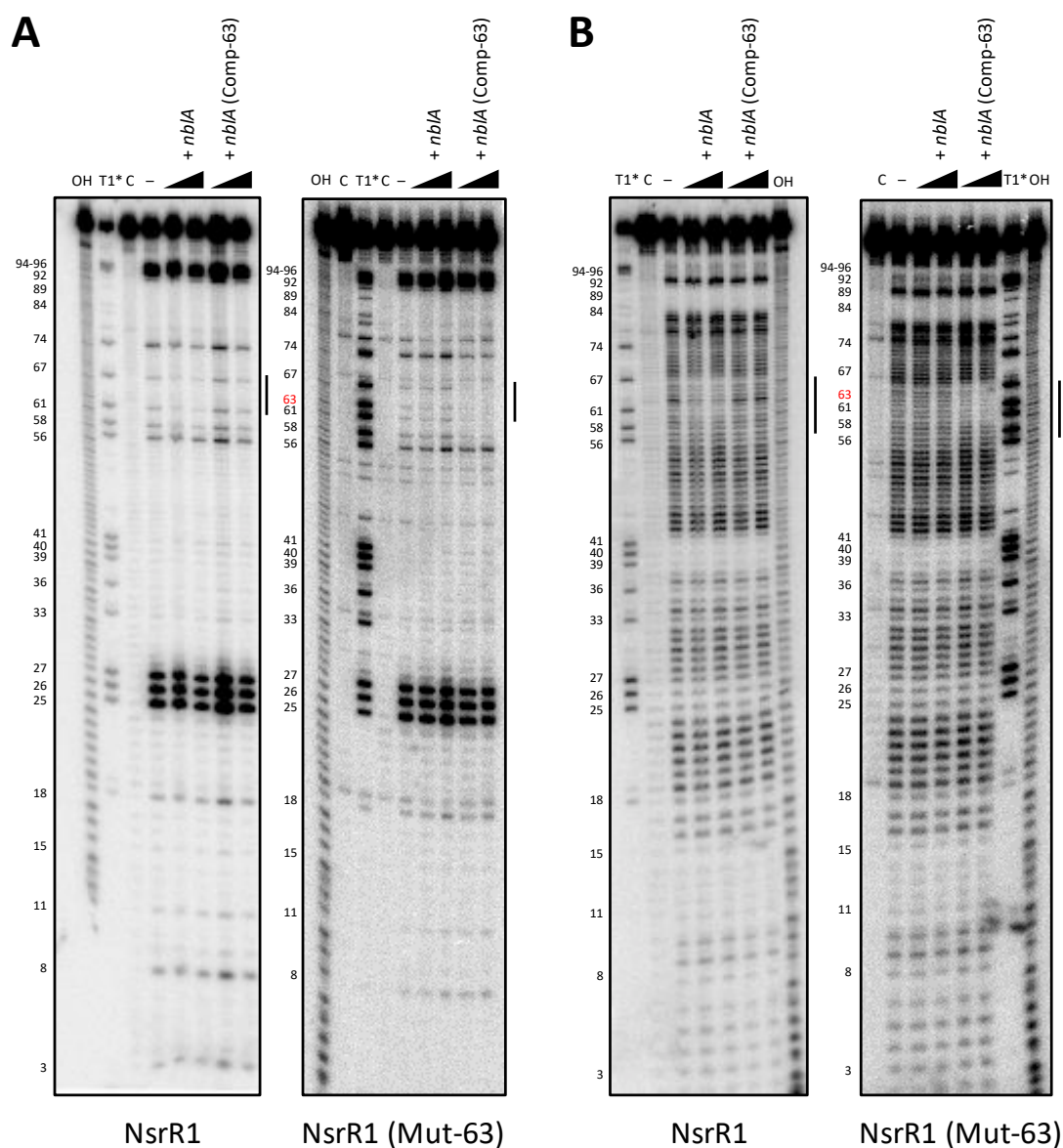
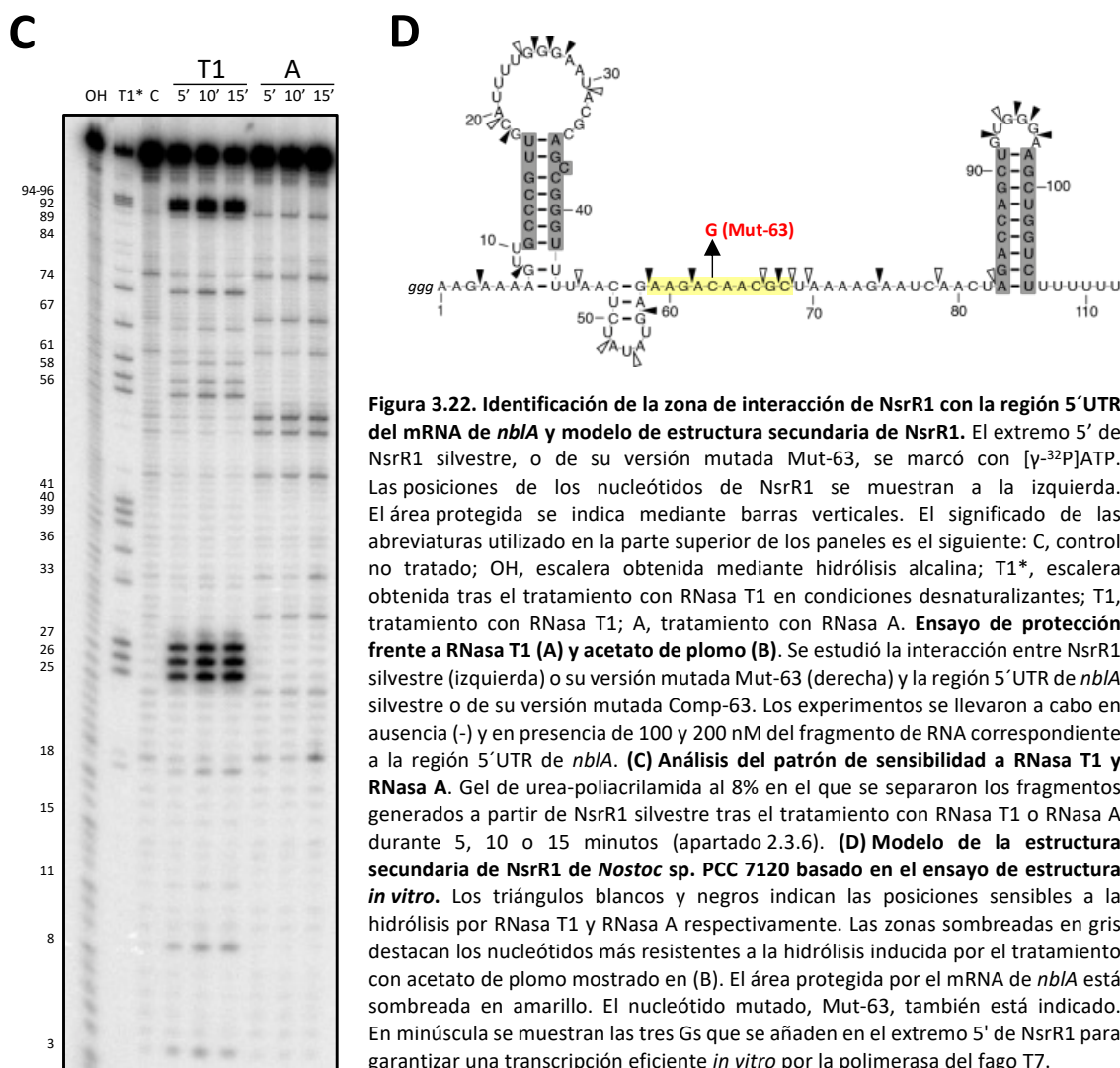


Figura 3.21. Verificación *in vivo* mediante un sistema heterólogo en *E. coli* de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *nblA*. (A) Interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *nblA* según la predicción del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). Los nucleótidos de *nblA* se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG aparece señalado en rojo. Las mutaciones introducidas en NsrR1 en las posiciones 63 (Mut-63) y 66 (Mut-66), así como sus correspondientes mutaciones compensatorias, Comp-63 y Comp-66, en las posiciones -18 y -21 de la región 5'UTR de *nblA*, están indicadas en rojo y azul respectivamente. (B) Cuantificación de sfGFP mediante fluorescencia. Se representan los niveles de fluorescencia relativa de cultivos de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con las versiones Comp-63 o Comp-66 de la fusión *nblA::sfGFP*, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsrR1, la versión Mut-63 o Mut-66 de NsrR1, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas de fluorescencia de ocho cultivos provenientes de colonias independientes. Para el cálculo de estos valores de fluorescencia se normalizó por la cantidad de células ($A_{600\text{ nm}}$), y se restaron los niveles de fluorescencia de células que portan pXG-0, un plásmido control sin *sfGFP*. La fluorescencia de las células portadoras de las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300 se considera en cada caso como 100%. Se indica el *p-value* correspondiente al test de *Student* en los casos en los que la diferencia de fluorescencia es significativa. La tabla muestra los valores de fluorescencia absolutos en unidades arbitrarias (u.a.) de las células conteniendo las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300. (C) Cuantificación de sfGFP mediante citometría de flujo. Los ensayos se realizaron con cultivos en estado estacionario de las estirpes de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con la versión Comp-63 de la fusión *nblA::sfGFP*, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsrR1, la versión Mut-63 de NsrR1, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300). Se adquirieron datos de 50.000 células por muestra.

Para verificar los nucleótidos implicados en la interacción entre NsrR1 y el mRNA de *nblA* se realizaron ensayos de protección *in vitro* (apartado 2.3.7). Para ello, NsrR1 silvestre o su versión mutada Mut-63 se marcaron en su extremo 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y se determinó la sensibilidad a la hidrólisis por RNasa T1 (Figura 3.22A) o acetato de plomo (Figura 3.22.B) en presencia o ausencia de un fragmento del mRNA de *nblA*, o de su versión mutada Comp-63, que se extiende desde el TSS hasta 60 nucleótidos dentro de la región codificante de *nblA*. Además, se estudió el patrón de sensibilidad que presenta NsrR1 al tratamiento con RNasa T1 y RNasa A (Figura 3.22C) para desarrollar un modelo de la estructura secundaria de NsrR1 (Figura 3.22D).





Cuando los ensayos de protección *in vitro* (Figura 3.22A-B) se realizan con las moléculas de NsrR1 y *nblA* silvestres, se observa protección a la hidrólisis por RNasa T1 o acetato de plomo entre las posiciones 59 y 68 de NsrR1 (Figura 3.22D). Esta zona protegida coincide exactamente con la zona de interacción predicha *in silico* (Figura 3.19). Esta protección no se produce cuando se combina NsrR1 silvestre con la versión mutada del mRNA de *nblA* Comp-63, si bien vuelve a observarse cuando los experimentos se llevan a cabo con la versión mutada de NsrR1 (Mut-63) y la correspondiente versión con la mutación compensatoria en *nblA* (Comp-63).

Todos los resultados obtenidos confirman la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR del mRNA de *nblA*. En la Figura 3.23 se muestra cómo la interacción entre las secuencias que codifican homólogos de NsrR1 y los mRNAs correspondientes a los homólogos de *nblA* está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen NsrR1. Este resultado es congruente con el hecho de que *nblA* apareciese en el análisis de CopraRNA (Tabla 3.4), el algoritmo que como ya se ha comentado, tiene en cuenta entre otros factores, la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas.

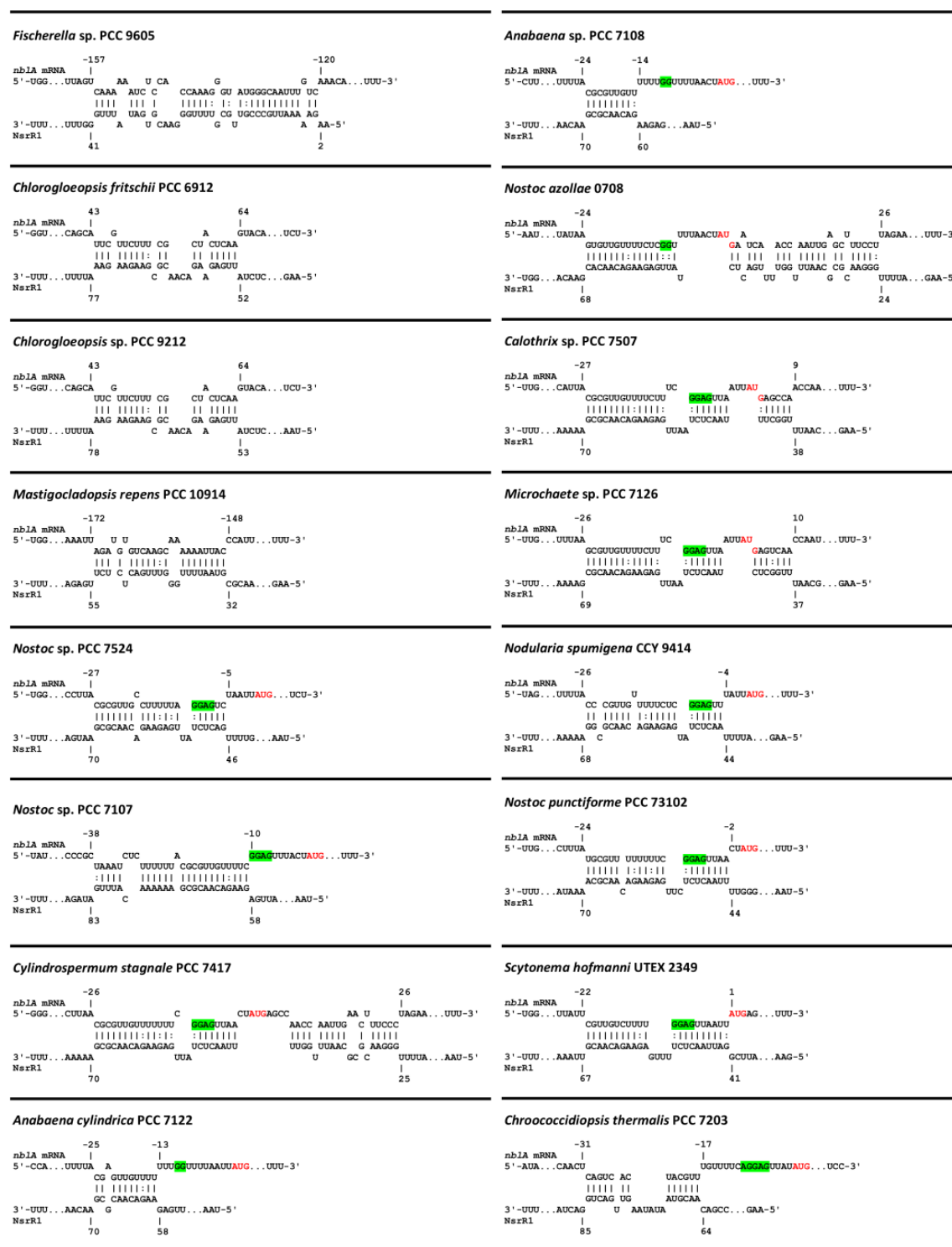


Figura 3.23. Conservación de la interacción predicha entre NsrR1 y el mRNA de *nblA* en cianobacterias. La posible interacción entre NsrR1 y el mRNA de *nblA* se calculó para cada cianobacteria mostrada en la Figura 3.13 con el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). El análisis se realizó desde 200 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de la traducción, hasta el codón de parada de la secuencia codificante de *nblA* y sus correspondientes homólogos. Los nucleótidos del mRNA de *nblA* se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG aparece señalado en rojo, y las posibles secuencias Shine-Dalgarno resaltadas en verde. Sólo se muestran las estirpes con una interacción estable predicha entre los nucleótidos -200 v +100 con respecto al inicio de la traducción.

3.2.5.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de *nblA* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Como se ha comentado anteriormente, la transcripción de *NsrR1* en *Nostoc* sp. PCC 7120 está regulada por la disponibilidad de nitrógeno combinado, de manera que la acumulación del transcrito *NsrR1* se reprime en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (véase Figura 3.15). Para estudiar *in vivo* en *Nostoc* sp. PCC 7120 el posible efecto de *NsrR1* sobre la expresión de *nblA* se utilizó una estirpe mutante que carece de *NsrR1* ($\Delta nsrR1$) (Tabla 2.1). Esta estirpe, que estaba disponible en el laboratorio, fue generada mediante el proceso de doble recombinación por delección descrito en el apartado 2.2.9.3, procedimiento mediante el cual se eliminó la región de DNA que contiene *nsrR1*. Las células que carecen de *NsrR1* no tienen un fenotipo aparente en condiciones de laboratorio. Además, no se observan diferencias de crecimiento con respecto a las células silvestres, ni en un medio que contiene amonio o nitrato, ni en un medio que carece de una fuente de nitrógeno combinado (Figura 3.24).

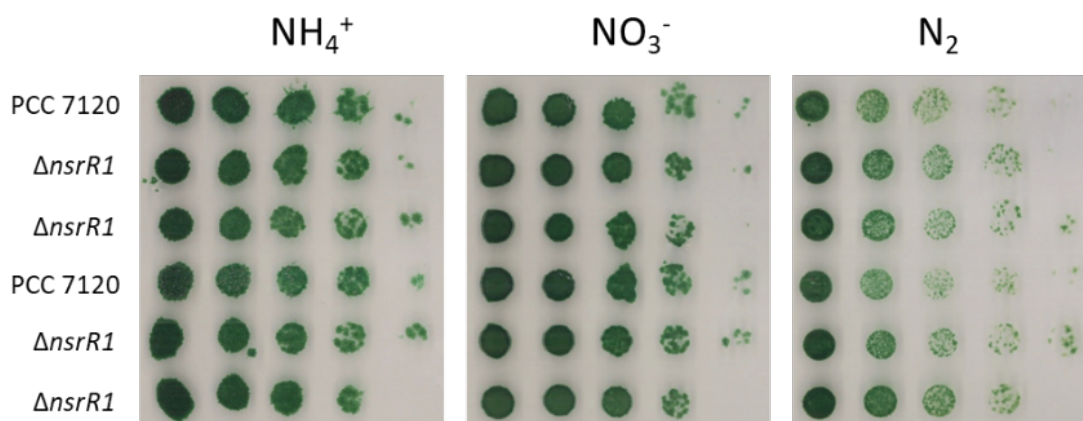


Figura 3.24. Crecimiento de la estirpe $\Delta nsrR1$ en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno. Las células procedían de cultivos líquidos establecidos en presencia de nitrato. Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en BG11₀, a una absorbancia $A_{750} = 0,3$. A partir de estas suspensiones, se prepararon diluciones seriadas de cuatro cultivos líquidos de clones independientes de la estirpe $\Delta nsrR1$, y de dos cultivos líquidos independientes de *Nostoc* sp. PCC 7120, usados como control. Se colocaron 10 μ l de estas suspensiones celulares en medio sólido con amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) como fuente de nitrógeno, o sin nitrógeno combinado (N_2). Las cajas se incubaron a 30°C con luz durante 10 días.

También se generó una estirpe, $\Delta nsrR1 + P_{petE::nsrR1}$ (Tabla 2.1), en la que la expresión de *NsrR1* está bajo el control del promotor de *petE*, un promotor inducible mediante la adición de cobre (Buikema y Haselkorn, 2001). De este modo, la transcripción de *NsrR1* pasa a estar regulada por cobre, de forma independiente a la fuente de nitrógeno disponible. Para la generación de esta estirpe se fusionó el promotor de *petE* a *nsrR1* mediante el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2, y el fragmento resultante se clonó en el plásmido replicativo pSAM221, generando el plásmido pIAE17 (Tabla 2.4), que se introdujo en la estirpe $\Delta nsrR1$ de *Nostoc* sp. PCC 7120 por conjugación (apartado 2.2.9.3).

Como se describe en (Mitschke *et al.*, 2011b), *nblA* se transcribe a partir de cinco TSS, tres de los cuales se inducen en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado (Figura 3.25A). Mediante análisis de Northern blot (Figura 3.25B), se confirmó que la inducción de la transcripción de *nblA* a partir de estos tres promotores en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado es dependiente de NtcA.

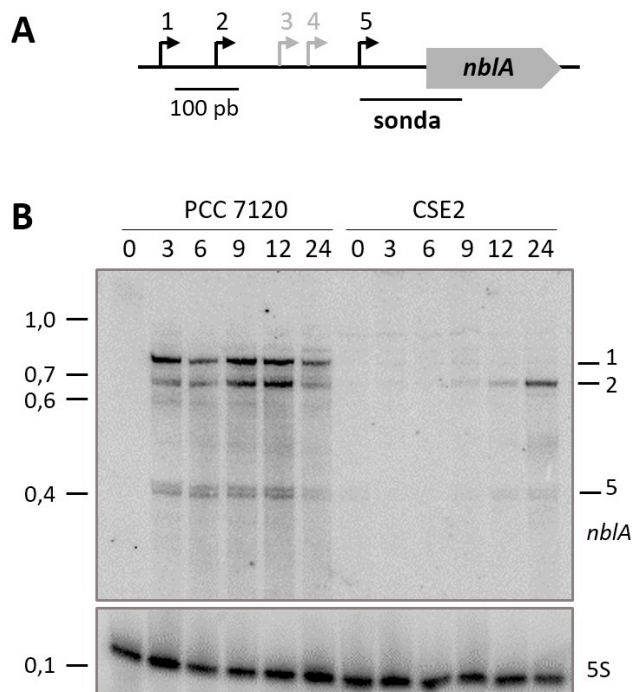


Figura 3.25. Identificación mediante Northern blot de los transcritos de *nblA* regulados por nitrógeno en *Nostoc* sp. PCC 7120. (A) Representación esquemática de la región que codifica *nblA* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Se indica con una barra negra la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot. La posición de los cinco TSS de *nblA* definidos en (Mitschke *et al.*, 2011b) se representa con flechas. Los TSS regulados por disponibilidad de nitrógeno, 1, 2 y 5 se representan en negro. **(B) Transcripción de *nblA* en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe CSE2.** Northern blot con 5 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe mutante *ntcA* (CSE2) cultivadas en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidas a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión de *nblA*. Se utilizó como sonda un fragmento de 166 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 253 y 254. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con una sonda complementaria al RNA 5S (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kb). Se señalan a la derecha los transcritos correspondientes a los TSS 1, 2 y 5.

Al objeto de analizar *in vivo* el posible efecto de NsrR1 sobre la regulación de *nblA* en *Nostoc* sp. PCC 7120, se comparó la acumulación de los transcritos de *nblA* en las estirpes con niveles alterados de NsrR1, $\Delta nsrR1$ y $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$. Para ello, se analizó mediante Northern blot la expresión de los transcritos de *nblA* en células de estas estirpes sometidas a distintos periodos de carencia de nitrógeno combinado (Figura 3.26). Para la realización de estos experimentos, a los cultivos de estas estirpes establecidos en amonio se les retiró el nitrógeno combinado del medio, situación en la que la transcripción de los transcritos 1, 2 y 5 de *nblA* se induce. Simultáneamente se les añadió 1,5 µM de $CuSO_4$ para inducir la expresión de NsrR1 a partir del promotor de *petE* en la estirpe $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$.

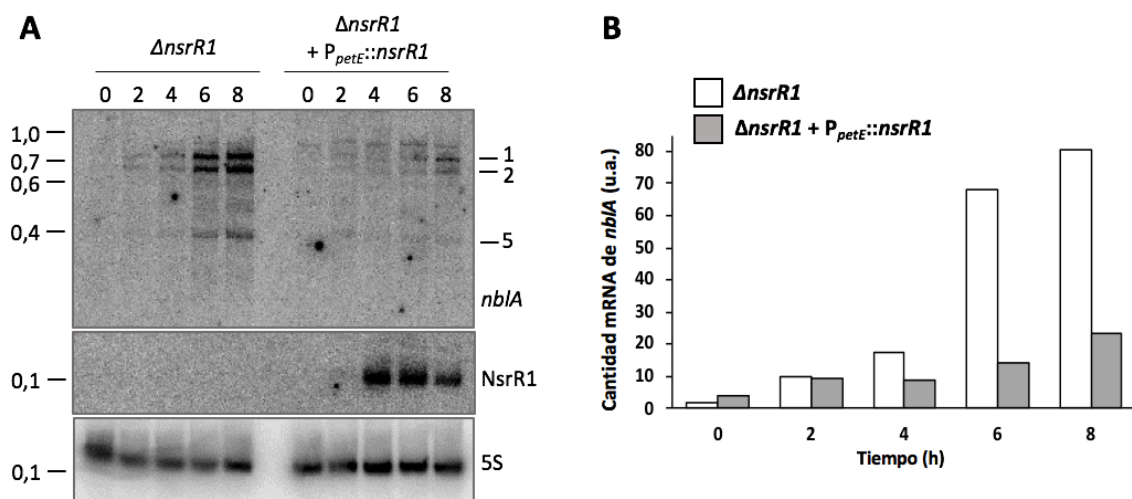


Figura 3.26. Efecto de NsrR1 sobre la acumulación de los transcritos de *nbIA* regulados por nitrógeno. **(A)** Northern blot con 5 μ g de RNA total procedente de células de las estirpes $\Delta nsrR1$ y $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$. Las células se cultivaron en presencia de amonio en un medio en ausencia de cobre (0), para evitar la expresión del promotor de *petE*, y posteriormente se transfirieron a un medio sin nitrógeno combinado al que se añadió 1,5 μ M de CuSO_4 , recogiendo muestras para su análisis tras el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión de *nbIA*. Se utilizó como sonda un fragmento de 166 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 253 y 254. El panel central muestra la expresión de NsrR1 en la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 639 nt (Figura 3.13) obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 158 y 159. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con una sonda complementaria al RNA 5S (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kb). Se señalan a la derecha los transcritos correspondientes a los TSS 1, 2 y 5. **(B)** Cuantificación de la acumulación del mRNA de *nbIA*. Se representa la suma de la cantidad correspondiente a los transcritos 1, 2 y 5 normalizada por la cantidad de RNA 5S en unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra un experimento representativo.

Se observa que la acumulación de los tres transcritos de *nbIA* regulados por nitrógeno se induce en la estirpe $\Delta nsrR1$ en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, los niveles de expresión de estos tres transcritos se reducen fuertemente en la estirpe $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$, en la que NsrR1 se transcribe a partir del promotor de *petE*. Como puede verse en la Figura 3.26B, tras 8 horas en ausencia de nitrógeno combinado, la cantidad del mRNA de *nbIA*, sumando los niveles de expresión de los tres transcritos, en la estirpe $\Delta nsrR1$ es aproximadamente 4 veces mayor que en la estirpe $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$. Estos resultados sugieren que NsrR1 tiene un significativo efecto negativo en la acumulación del mRNA de *nbIA* en *Nostoc* sp. PCC 7120, lo que podría afectar en última instancia a la acumulación de la proteína NbIA según la disponibilidad de nitrógeno.

Para analizar la acumulación de la proteína NbIA en las diferentes estirpes, se generaron y purificaron anticuerpos frente a la proteína NbIA recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 tal y como se describe en el apartado 2.4.5. Desafortunadamente, aunque con estos anticuerpos se consiguió detectar mediante Western blot la proteína NbIA en extractos celulares de *E. coli* que sobreexpresan NbIA (Figura 3.27), no fue posible detectar NbIA en extractos de *Nostoc* sp. PCC 7120, ni siquiera en las condiciones en las que la inducción de la expresión de *nbIA* es máxima (no mostrado).

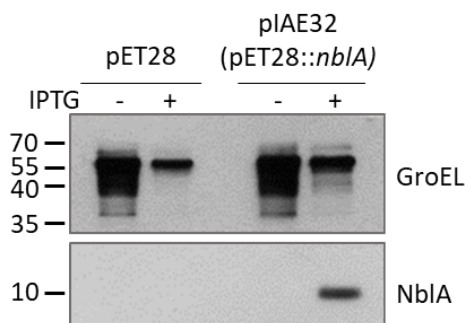


Figura 3.27. Detección de NblA en células de *E. coli*. Western blot de células de *E. coli* que contienen el vector pET-28a(+), o pIAE32, un plásmido derivado de pET-28a(+) desde el que se expresa el gen *nblA* de forma inducible por IPTG. Se cargó proteína total obtenida de 10 µl de cultivos que portan los plásmidos indicados, tras su incubación durante 3 horas en ausencia (-) o presencia (+) de IPTG. Se utilizaron anticuerpos generados frente a la proteína NblA recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120, o anticuerpos comerciales frente a la proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kDa).

Como se ha mencionado en la Introducción, la proteína NblA interviene en el proceso de degradación de los ficobilisomas, facilitando la interacción del ficobilisoma con un complejo de proteasas encargadas de su degradación en diferentes situaciones de estrés. Por ello, se realizaron espectros de absorción de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe $\Delta nsrR1$, cultivadas en presencia de amonio, y después de 24 ó 48 horas tras la eliminación del nitrógeno combinado del medio (Figura 3.28). En esta figura se observa que las células de la estirpe $\Delta nsrR1$ tienen un contenido de ficocianina, estimado a partir de la absorbancia a 635 nm, más bajo en todas las condiciones estudiadas, incluso en presencia de amonio. Además, el contenido de ficocianina disminuye en ambas estirpes cuando se elimina el nitrógeno combinado del medio. Sin embargo, mientras que en la estirpe silvestre el contenido de ficocianina es similar después de 24 y 48 horas tras la retirada del nitrógeno combinado del medio, en la estirpe $\Delta nsrR1$, la reducción en el contenido de ficocianina es más acusada a las 48 horas que a las 24 horas (Figura 3.28B). Por lo tanto, las diferencias detectadas en el contenido de pigmentos celulares en las estirpes estudiadas son consistentes con que NsrR1 afecte negativamente a la acumulación de NblA en *Nostoc* sp. PCC 7120.

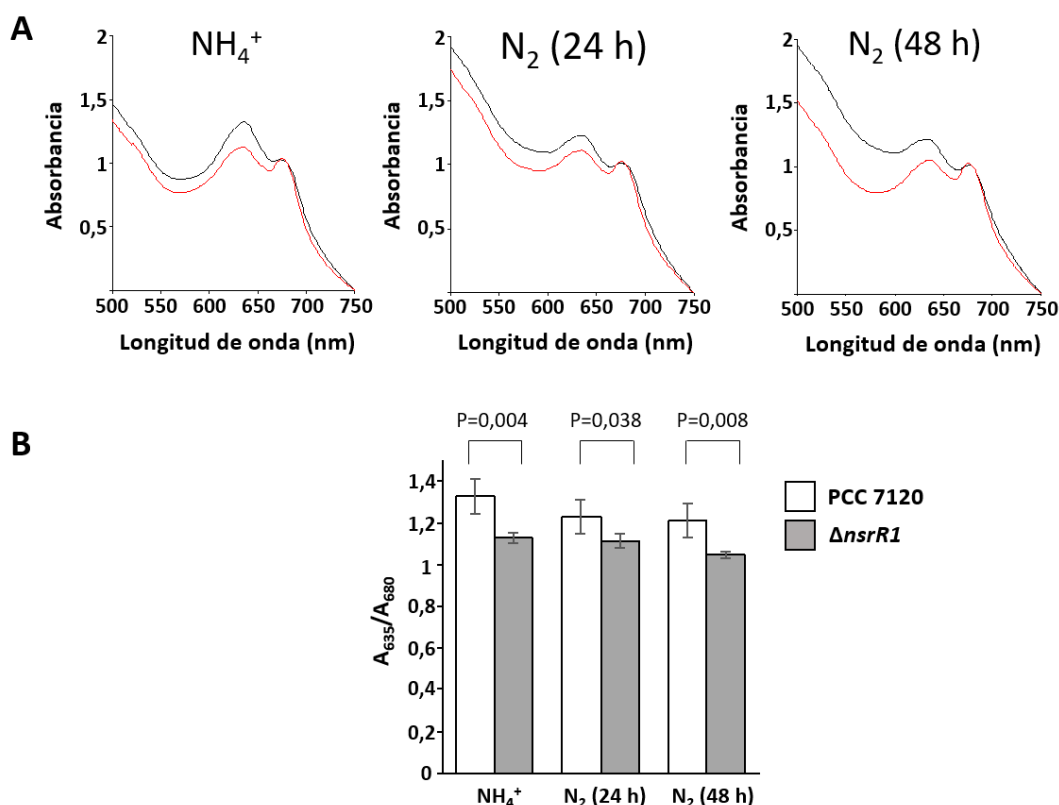


Figura 3.28. Análisis del contenido de pigmentos celulares en células de *Nostoc* sp. PCC 7120. (A) Espectros de absorción de células enteras. Los espectros se realizaron con cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7120 (negro) y de la estirpe $\Delta nsrR1$ (rojo), creciendo en presencia de amonio (izquierda), y tras 24 (centro) o 48 horas (derecha) en condiciones de carencia de nitrógeno combinado. Los espectros están normalizados con respecto al contenido de clorofila (A_{680}). **(B) Cuantificación relativa del contenido de ficocianina.** Representación de la ratio A_{635}/A_{680} en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe $\Delta nsrR1$, cultivadas en presencia de amonio, y tras 24 y 48 horas en condiciones de carencia de nitrógeno combinado. Las barras de error representan la desviación típica de cuatro experimentos. Se indica el *p*-value correspondiente al test de Student.

3.2.6. Regulación ejercida por NsrR1 sobre el mRNA de *all1871*

3.2.6.1. Verificación de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871*

Con el fin de verificar que la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871* tiene lugar en la región predicha por IntaRNA (Figura 3.19), se introdujo una mutación puntual en la región de la secuencia de NsrR1 que se predice que está implicada en la interacción con el mRNA *all1871*, y se realizó además la correspondiente mutación compensatoria en la región 5'UTR de este mRNA. El método seguido para el diseño de estas mutaciones fue el mismo que el descrito en el apartado 3.1.4. Así, con el apoyo del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), se seleccionó el nucleótido de la secuencia de NsrR1 cuya mutación afectaría más drásticamente a la interacción predicha entre este sRNA y el mRNA de *all1871*, lo que se reflejaría en la supresión de la reducción en los niveles de fluorescencia observados. Igualmente, se diseñó la mutación compensatoria, con la que se espera que la interacción se restablezca, produciéndose de nuevo una reducción en los niveles de fluorescencia.

Las predicciones realizadas con el algoritmo IntaRNA (Figura 3.19) sugieren que la posible región de NsrR1 que interacciona con la región 5'UTR de *all1871* está comprendida entre los nucleótidos 38-82. Teniendo en cuenta esta predicción, se introdujo una mutación puntual, cambio de U a G, en el nucleótido 51 de la secuencia de NsrR1 (Figura 3.29A). La mutagénesis se realizó mediante el procedimiento del "Megacebador" descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 197 y 198, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 295 y 296 (Tabla 2.5). Esta mutación se denominó Mut-51, y el plásmido que contiene esta versión mutada en lugar de la versión silvestre se denominó pIAE20 (Tabla 2.4). Además, se introdujo la correspondiente mutación compensatoria, cambio de G a C, en el nucleótido -13 de la región 5'UTR de *all1871* (Figura 3.29A). De nuevo, la mutagénesis se realizó mediante el procedimiento del "Megacebador" descrito en el apartado 2.2.6.2, utilizando como cebadores externos los oligonucleótidos 247 y 248, y como cebadores solapantes los oligonucleótidos 303 y 304 (Tabla 2.5). Esta mutación se denominó Comp-51, y el plásmido que portaba esta versión mutada en lugar de la versión silvestre se denominó pIAE22 (Tabla 2.4).

Una vez realizadas estas mutaciones, se evaluaron los cambios en los niveles de fluorescencia de las células de *E. coli* que portaban diferentes combinaciones de estos plásmidos. Las medidas de fluorescencia de los cultivos líquidos de *E. coli* se llevaron a cabo mediante fluorimetría (Figura 3.29B), y en medio sólido LB (Figura 3.29C), según se describe en el apartado 2.6. Cuando se combina la versión mutada de NsrR1 (Mut-51) con la región 5'UTR silvestre de *all1871* se observa una recuperación significativa de los niveles de fluorescencia con respecto a los niveles obtenidos en presencia de NsrR1 silvestre. Esta observación sugiere que la mutación en el nucleótido 51 de NsrR1 reduce drásticamente la interacción entre este sRNA y la región 5'UTR de *all1871*. Aunque esta recuperación es estadísticamente significativa, sigue habiendo una represión sustancial con respecto al control que lleva el plásmido pJV300. Hay que tener en cuenta que la interacción predicha entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871* es muy extensa (Figura 3.19), implicando 39 nucleótidos, de los cuáles sólo se ha mutado el nucleótido de la posición 51 de NsrR1. De este modo, es muy probable que dicha mutación puntual solo provoque una desestabilización parcial de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871*. No obstante, cuando se combina la versión mutada de NsrR1 con la versión con la mutación compensatoria en la región 5'UTR de *all1871*, se observa de nuevo una reducción significativa en los niveles de fluorescencia, similar a la obtenida con la combinación de los transcritos silvestres. Estos resultados demuestran que la interacción de NsrR1 con la región 5'UTR del mRNA de *all1871* tiene lugar a través de los nucleótidos predichos por IntaRNA, así como el efecto de dicha interacción sobre la traducción de la proteína All1871.

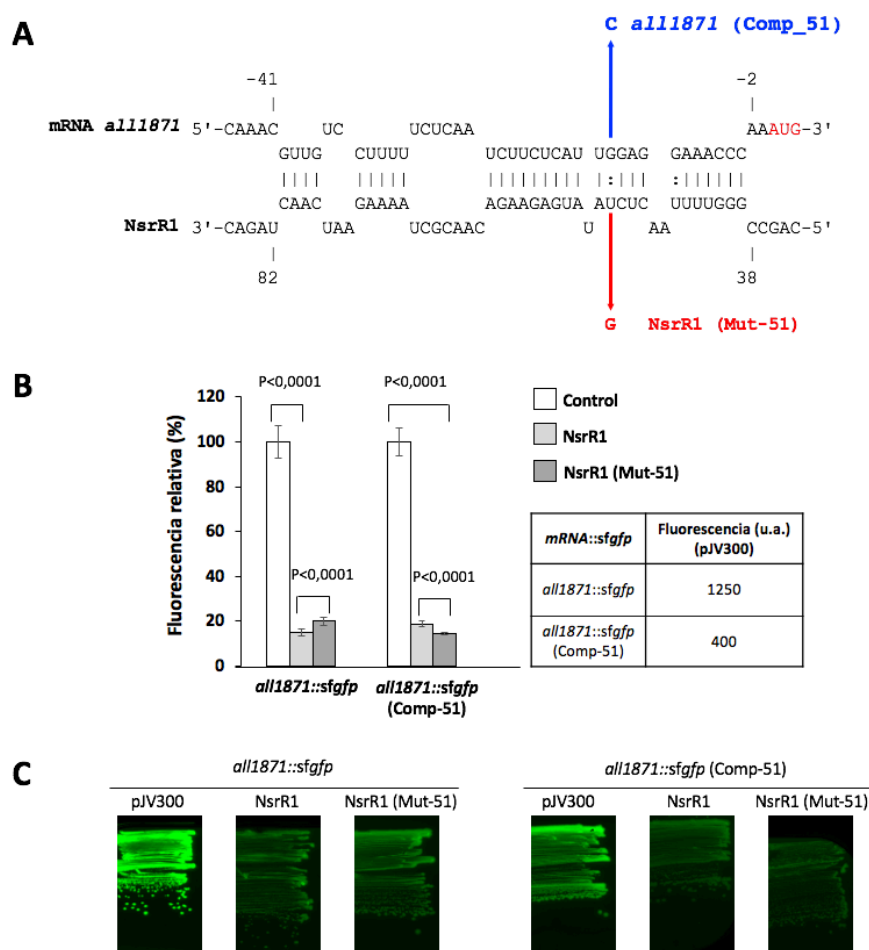


Figura 3.29. Verificación *in vivo* mediante un sistema heterólogo en *E. coli* de la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871*. (A) Interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871* según la predicción del algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). Los nucleótidos de *all1871* se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG aparece señalado en rojo. La mutación introducida en NsrR1 en la posición 51 (Mut-51) así como su correspondiente mutación compensatoria (Comp-51), en la posición -13 de la región 5'UTR de *all1871*, están indicadas en rojo y azul respectivamente. (B) **Cuantificación de sfGFP mediante fluorescencia.** Se representan los niveles de fluorescencia relativa de cultivos de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con la versión Comp-51 de la fusión *all1871::sfGFP*, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsrR1, la versión Mut-51 de NsrR1, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas de fluorescencia de ocho cultivos provenientes de colonias independientes. Para el cálculo de estos valores de fluorescencia se normalizó por la cantidad de células ($A_{600\text{ nm}}$), y se restaron los niveles de fluorescencia de células que portan pXG-0, un plásmido control sin *sfGFP*. La fluorescencia de las células portadoras de las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300 se considera en cada caso como 100%. Se indica el *p-value* correspondiente al test de *Student* en los casos en los que la diferencia de fluorescencia es significativa. La tabla muestra los valores de fluorescencia absolutos en unidades arbitrarias (u.a.) de las células conteniendo las fusiones *mRNA::sfGFP* combinadas con el plásmido control pJV300. (C) **Visualización de la fluorescencia en placas con medio sólido LB.** Se muestra la fluorescencia de células de *E. coli* que portan un plásmido con la versión silvestre, o con la versión Comp-51 de la fusión *all1871::sfGFP*, combinado con un plásmido que codifica la versión silvestre de NsrR1, la versión Mut-51 de NsrR1, o un RNA no relacionado usado como control (pJV300).

La interacción entre NsrR1 y el mRNA de *all1871* se confirmó mediante ensayos de protección *in vitro* (apartado 2.3.7). Para ello, NsrR1 se marcó en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP, y se determinó la sensibilidad a la hidrólisis por RNasa T1, RNasa A o acetato de plomo en presencia o ausencia de un fragmento del mRNA de *all1871* que se extiende desde el TSS hasta 60 nucleótidos dentro de la región codificante de *all1871* (Figura 3.30).

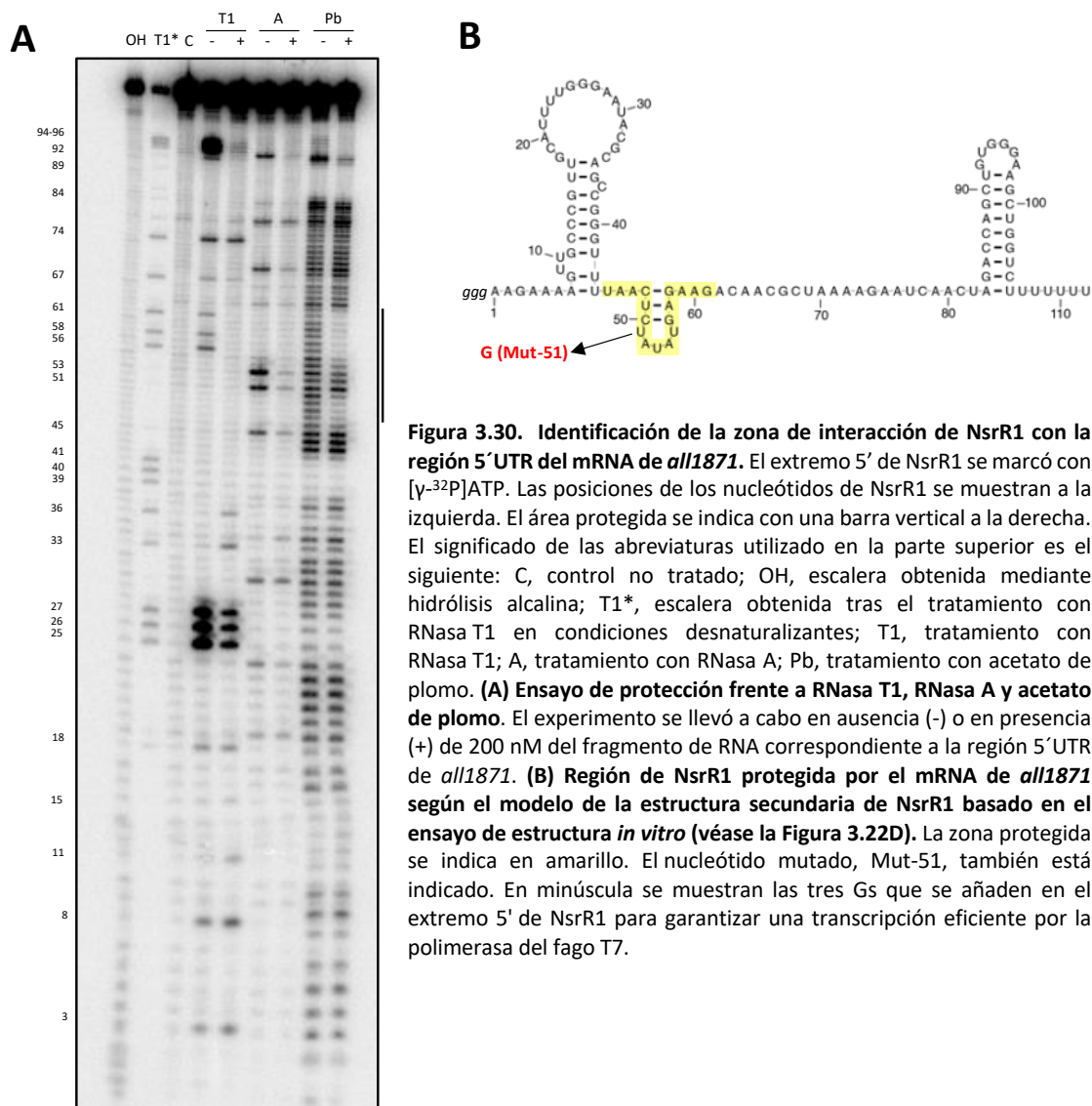


Figura 3.30. Identificación de la zona de interacción de NsrR1 con la región 5' UTR del mRNA de *all1871*. El extremo 5' de NsrR1 se marcó con [γ - 32 P]ATP. Las posiciones de los nucleótidos de NsrR1 se muestran a la izquierda. El área protegida se indica con una barra vertical a la derecha. El significado de las abreviaturas utilizado en la parte superior es el siguiente: C, control no tratado; OH, escalera obtenida mediante hidrólisis alcalina; T1*, escalera obtenida tras el tratamiento con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes; T1, tratamiento con RNasa T1; A, tratamiento con RNasa A; Pb, tratamiento con acetato de plomo. **(A) Ensayo de protección frente a RNasa T1, RNasa A y acetato de plomo.** El experimento se llevó a cabo en ausencia (-) o en presencia (+) de 200 nM del fragmento de RNA correspondiente a la región 5' UTR de *all1871*. **(B) Región de NsrR1 protegida por el mRNA de *all1871* según el modelo de la estructura secundaria de NsrR1 basado en el ensayo de estructura *in vitro* (véase la Figura 3.22D).** La zona protegida se indica en amarillo. El nucleótido mutado, Mut-51, también está indicado. En minúscula se muestran las tres Gs que se añaden en el extremo 5' de NsrR1 para garantizar una transcripción eficiente por la polimerasa del fago T7.

Se observa que la región entre las posiciones 45 y 61 de NsrR1 está protegida de la hidrólisis, tanto por Pb como por RNasa T1 o RNasa A, en presencia del fragmento del mRNA de *all1871*. Esta región está incluida en la zona de interacción predicha *in silico*, que está comprendida entre los nucleótidos 38 y 82 (Figura 3.19). Por otro lado, se observa un incremento en la sensibilidad a la hidrólisis por RNasa T1 en las posiciones 11, 33 y 36, y a la hidrólisis por RNasa A en la posición 34, lo que sugiere un cambio conformacional en NsrR1 cuando interacciona con el mRNA de *all1871*. Además, los nucleótidos 92-97, correspondientes al lazo de la horquilla terminadora, aparecen protegidos. Este hecho puede ser una consecuencia del cambio conformacional mencionado anteriormente. No obstante, también podría sugerir la posibilidad de que existan interacciones adicionales con el mRNA de *all1871*.

Todos los resultados descritos confirman la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR del mRNA de *all1871*. En la Figura 3.31 se muestra cómo la interacción entre las secuencias que codifican homólogos de NsrR1 y los mRNAs correspondientes a los homólogos de *all1871* está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen NsrR1. Este resultado es congruente con el hecho de que *all1871* apareciese en el análisis de CopraRNA (Tabla 3.4), el algoritmo que tiene en cuenta la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas.

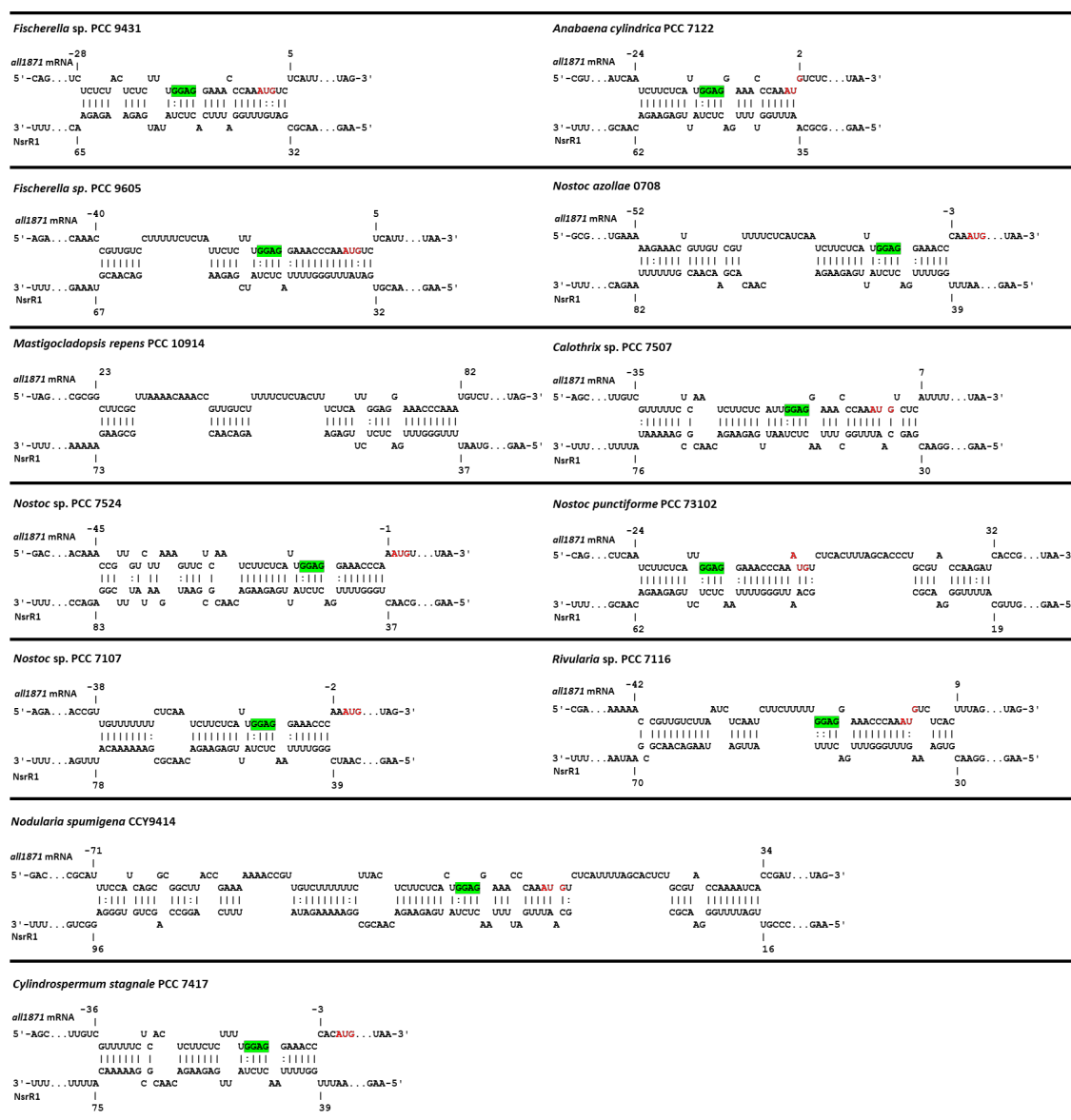


Figura 3.31. Conservación de la interacción entre NsrR1 y el mRNA de *all1871* en cianobacterias. La posible interacción entre NsrR1 y el mRNA de *all1871* se calculó para cada cianobacteria mostrada en la Figura 3.14 con el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017). El análisis se realizó utilizando un fragmento que se extiende desde 200 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de la traducción, hasta el codón de parada de la secuencia codificante de *all1871* y sus correspondientes homólogos. Los nucleótidos del mRNA de *all1871* se numeran con respecto al inicio de la traducción. El codón AUG aparece señalado en rojo, y las posibles secuencias Shine-Dalgarno resaltadas en verde. Sólo se muestran las estirpes con una interacción estable predicha entre los nucleótidos -200 y +100 con respecto al inicio de la traducción.

3.2.6.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Como se describe en (Mitschke *et al.*, 2011b), *all1871* se transcribe a partir de un TSS que se induce en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado (Figura 3.32A). Antes de proceder con la verificación *in vivo* en *Nostoc* sp. PCC 7120 de la regulación que ejerce NsrR1 sobre *all1871*, se llevó a cabo la caracterización de la regulación transcripcional de este mRNA mediante Northern blot, tanto en la estirpe silvestre de *Nostoc* sp. PCC 7120, como en las estirpes mutantes *ntcA* (CSE2) y *hetR* (216) (Tabla 2.1), en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Figura 3.32B).

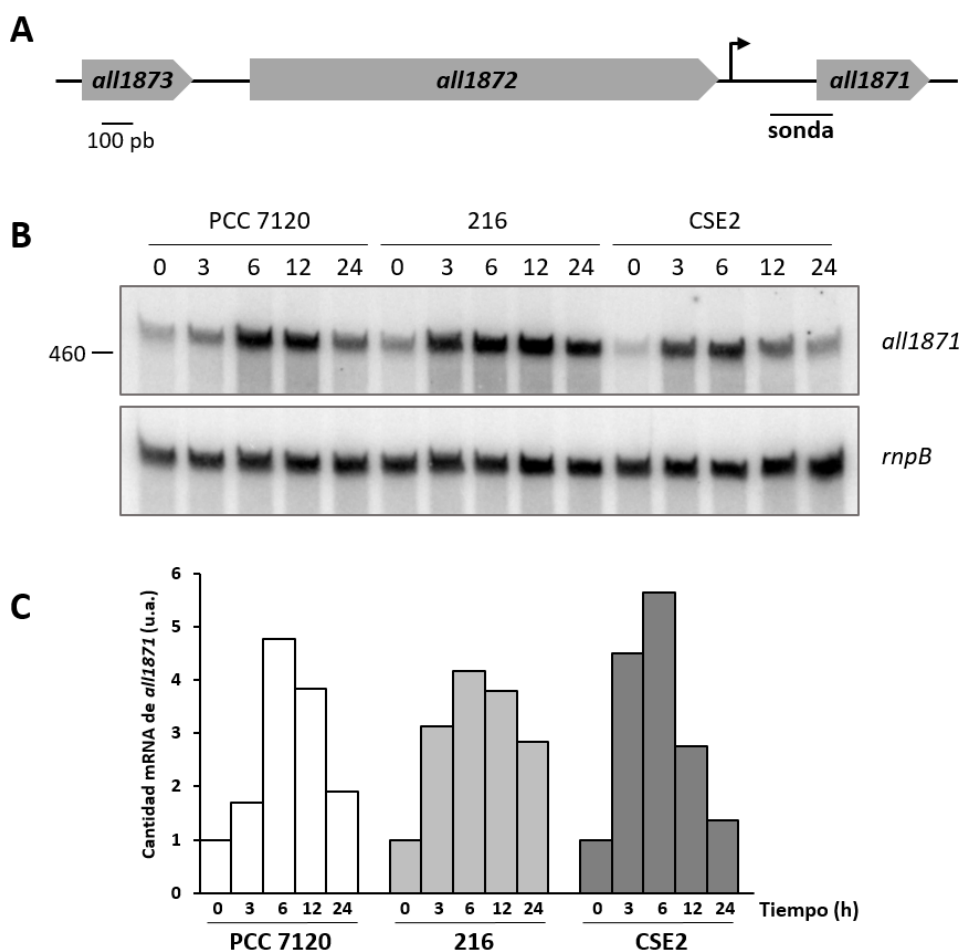


Figura 3.32. Regulación por nitrógeno del transcrito de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes 216 y CSE2. (A) Representación esquemática del entorno genómico de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Se indica con una barra negra la región utilizada como sonda en los análisis de Northern blot. La posición del TSS de *all1871* definido en (Mitschke *et al.*, 2011b) se representa con una flecha negra. (B) Análisis de la regulación del transcrito de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes 216 y CSE2. Northern blot con 10 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes *hetR* (216) y *ntcA* (CSE2) cultivadas en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidas a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito de *all1871*. Se utilizó como sonda un fragmento de 197 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 247 y 248. La posición del transcrito *rnpB* (460 nt) se indica a la izquierda. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. (C) Cuantificación de la acumulación del mRNA de *all1871*. Se representa la cantidad de transcrito *all1871* con respecto a la cantidad presente en cada estirpe en presencia de amonio (0) normalizada por la cantidad de RNA *rnpB* en unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra un experimento representativo.

En la Figura 3.32B puede observarse una inducción transitoria del transcrito de *all1871* en la estirpe silvestre en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado que no depende del regulador NtcA, como se deduce de los resultados obtenidos en la estirpe mutante *ntcA* (CSE2). Además, la dinámica de expresión del transcrito *all1871* en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado es complementaria a la observada para NsrR1 (véase Figura 3.15). Esta observación es consistente con que NsrR1 esté implicado en la regulación de *all1871*. Finalmente, la inducción de la expresión de *all1871* no depende de HetR, lo que sugiere que tendría lugar en todas las células del filamento.

Para analizar la acumulación de la proteína All1871, se generaron y purificaron anticuerpos frente a la proteína All1871 recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120, tal y como se describe en el apartado 2.4.5. y se llevaron a cabo análisis de Western blot con el anticuerpo frente a All1871 y extractos celulares obtenidos a partir de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 sometidas a condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Figura 3.33), observándose un incremento transitorio de All1871 similar al observado para el mRNA correspondiente.

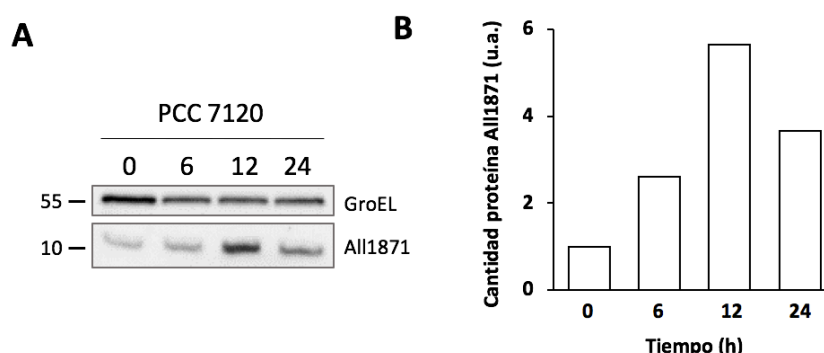


Figura 3.33. Detección de All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120. (A) Western blot con 40 µg de proteína de la fracción soluble de extractos celulares obtenidos de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7120 establecidos en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidos a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El análisis se realizó con anticuerpos generados frente a la proteína All1871 recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 purificada, o con anticuerpos comerciales frente a la proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kDa). (B) Cuantificación de la acumulación de All1871. Se representa la cantidad de All1871 normalizada por la cantidad de GroEL en unidades arbitrarias (u.a.). Se muestra un experimento representativo.

Al objeto de confirmar *in vivo* el posible efecto de NsrR1 sobre la regulación de *all1871*, se comparó la expresión de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe Δ *nsrR1* mediante análisis de Northern blot realizados a partir de RNA extraído de cultivos de estas estirpes establecidos en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, a los que se añadió 10 mM de amonio (Figura 3.34). La adición de amonio provoca un aumento drástico en los niveles de NsrR1 (véase Figura 3.16), motivo por el que se seleccionó esta estrategia experimental para maximizar los posibles efectos de este sRNA.

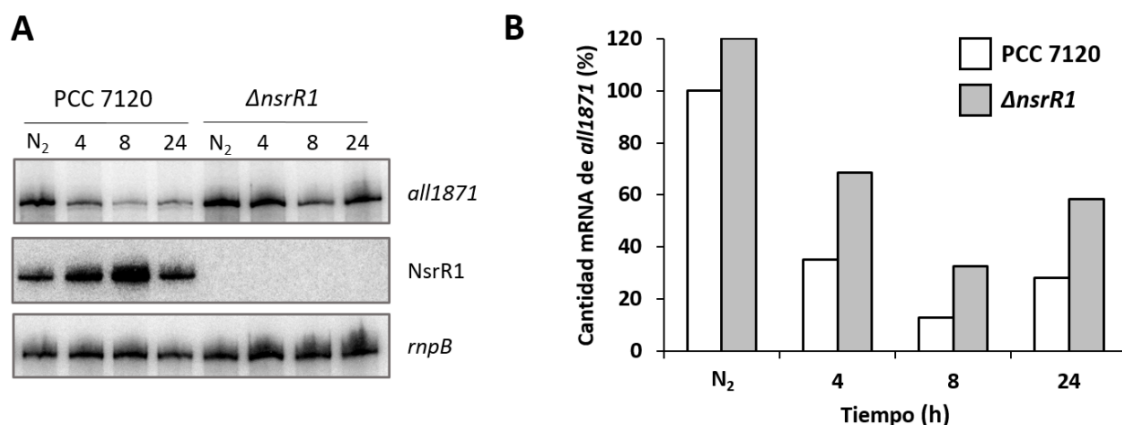


Figura 3.34. Efecto de NsrR1 sobre la acumulación del transcrito de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120. **(A)** Northern blot con 3 μ g de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe $\Delta nsrR1$ creciendo a expensas de nitrógeno atmosférico (N₂), y posteriormente cultivadas durante el número de horas indicado tras la adición de 10 mM de NH₄Cl y 20 mM TES-NaOH (pH 7,5) al medio. El panel superior muestra la expresión del transcrito de *all1871*. Se utilizó como sonda un fragmento de 197 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 247 y 248. El panel central muestra la expresión del transcrito NsrR1 utilizando la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 639 nt (Figura 3.13) obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 158 y 159. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. **(B) Cuantificación de la acumulación de mRNA de *all1871*.** Se representa la cantidad de transcrito *all1871* normalizada por la cantidad de transcrito *rnpB*. Se ha considerado como 100% la acumulación de *all1871* de la estirpe de *Nostoc* sp. PCC 7120 en condiciones de carencia de nitrógeno combinado (N₂). Se muestra un experimento representativo.

Se observa que en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado la estirpe $\Delta nsrR1$ acumula un 20% más del mRNA de *all1871* que la estirpe silvestre. Igualmente, mientras que la adición de amonio al medio provoca una reducción drástica de los niveles de *all1871* en la estirpe silvestre, concomitante con la inducción de NsrR1, esta reducción es menos acusada en la estirpe mutante $\Delta nsrR1$ (Figura 3.34B). Estos resultados sugieren que NsrR1 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120, lo que podría afectar en última instancia a la acumulación de la proteína All1871 en función de la disponibilidad de nitrógeno.

Finalmente, con el fin de analizar *in vivo* el posible efecto de NsrR1 sobre la acumulación de la proteína All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120, se llevaron a cabo análisis de Western blot con el anticuerpo frente a All1871, y extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de las estirpes *Nostoc* sp. PCC 7120 y $\Delta nsrR1$ establecidos en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, a los que se les añadió 10 mM de amonio (Figura 3.35).

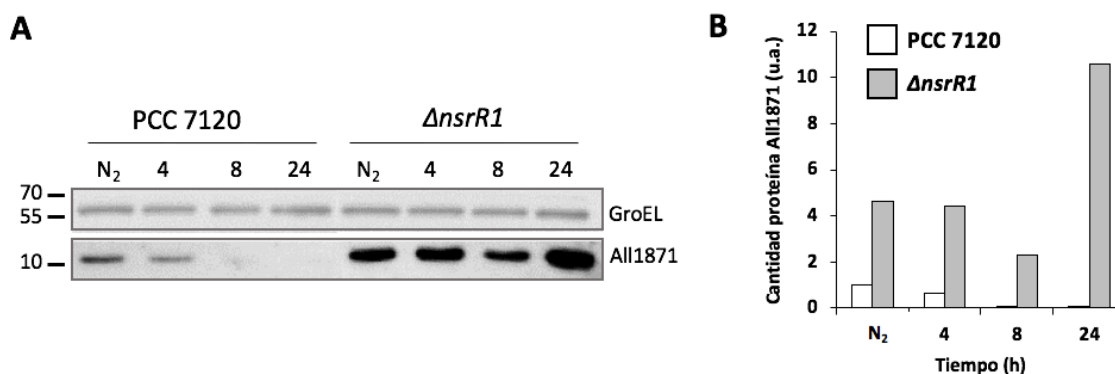


Figura 3.35. Detección de All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe $\Delta nsrR1$. (A) Western blot con 40 μ g de proteína de la fracción soluble de extractos celulares obtenidos de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe $\Delta nsrR1$ creciendo a expensas de nitrógeno atmosférico (N₂), y posteriormente cultivados durante el número de horas indicado tras la adición de 10 mM de NH₄Cl y 20 mM TES-NaOH (pH 7,5) al medio. El análisis se realizó con anticuerpos generados frente a la proteína All1871 recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 purificada, o con anticuerpos comerciales frente a la proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kDa). (B) Cuantificación de la acumulación de All1871. Se representa la cantidad de All1871 normalizada por la cantidad de GroEL en unidades arbitrarias (u.a.). Se ha considerado como 1 la acumulación de All1871 de la estirpe de *Nostoc* sp. PCC 7120 en condiciones deficiencia de nitrógeno combinado (0). Se muestra un experimento representativo.

Se observa que en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado la estirpe $\Delta nsrR1$ acumula casi 5 veces más All1871 que la estirpe silvestre de *Nostoc* sp. PCC 7120. Además, de forma consistente con las observaciones respecto a la acumulación del transcrito *all1871* (véase Figura 3.34), la disminución de la cantidad de All1871 en respuesta a la adición de amonio al medio es menos acusada en la estirpe $\Delta nsrR1$, que presenta una reducción de un 5% a las 4 horas y de un 50% a las 8 horas, mientras que en la estirpe silvestre se aprecia una disminución de un 35% y de un 95% respectivamente (Figura 3.35B). Todos estos resultados indican que NsrR1 afecta negativamente a la acumulación de All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120.

3.2.7. Caracterización funcional de la proteína All1871

Muchos de los genes identificados en los análisis de dRNA-Seq (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b) como potencialmente implicados en la respuesta al estrés nutricional por carencia de nitrógeno en *Nostoc* sp. PCC 7120, son genes de función desconocida. Uno de estos genes de función desconocida es *all1871*, que tal y como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, presenta una respuesta significativa ante la situación de deficiencia de nitrógeno combinado, además de estar sometido a una regulación postranscripcional por NsrR1. Con objeto de intentar esclarecer la posible función de All1871, se ha estudiado su expresión en los filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120, y se ha llevado a cabo la caracterización de un mutante que carece de esta proteína.

3.2.7.1. Localización de la expresión de *all1871* en los filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120 durante el proceso de diferenciación de los heterocistos

Al objeto de analizar la expresión de *all1871* en los filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120, se generó una fusión traduccional con un segmento que contiene desde la posición -200 con respecto al TSS de *all1871* hasta el final de su secuencia codificante, de manera que la pauta abierta de lectura de *all1871* queda fusionada traduccionalmente a la proteína GFP-mut2 (Cormack *et al.*, 1996). Para la generación de esta estirpe, que se denominó *all1871::gfp* (Tabla 2.1), se construyó el plásmido pELV75 (Tabla 2.3), que se introdujo por conjugación (apartado 2.2.9.3) en *Nostoc* sp. PCC 7120. Este plásmido se integró por recombinación homóloga en el cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120, de forma que la fusión *all1871::gfp* tiene aguas arriba del promotor el mismo contexto genómico que el gen *all1871* en la estirpe silvestre (Figura 3.36A). La estirpe *all1871::gfp* se utilizó para analizar la expresión de la proteína de fusión All1871-GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 3.36B). El ensayo se realizó con filamentos de la estirpe *all1871::gfp* cultivados durante 5 días en medio sólido carente de nitrógeno combinado. Se observa que, aunque la fusión traduccional *all1871::gfp* se expresa en todo el filamento, aparecen picos de fluorescencia asociados a los heterocistos que coinciden con las células que tienen baja autofluorescencia roja, indicativa de la diferenciación de heterocistos maduros. Estos resultados indican que, aunque *all1871* se estaría transcribiendo y traduciendo en todas las células del filamento, es más abundante en los heterocistos, por lo que la proteína All1871 podría ejercer una función diferencial en heterocistos frente a células vegetativas.

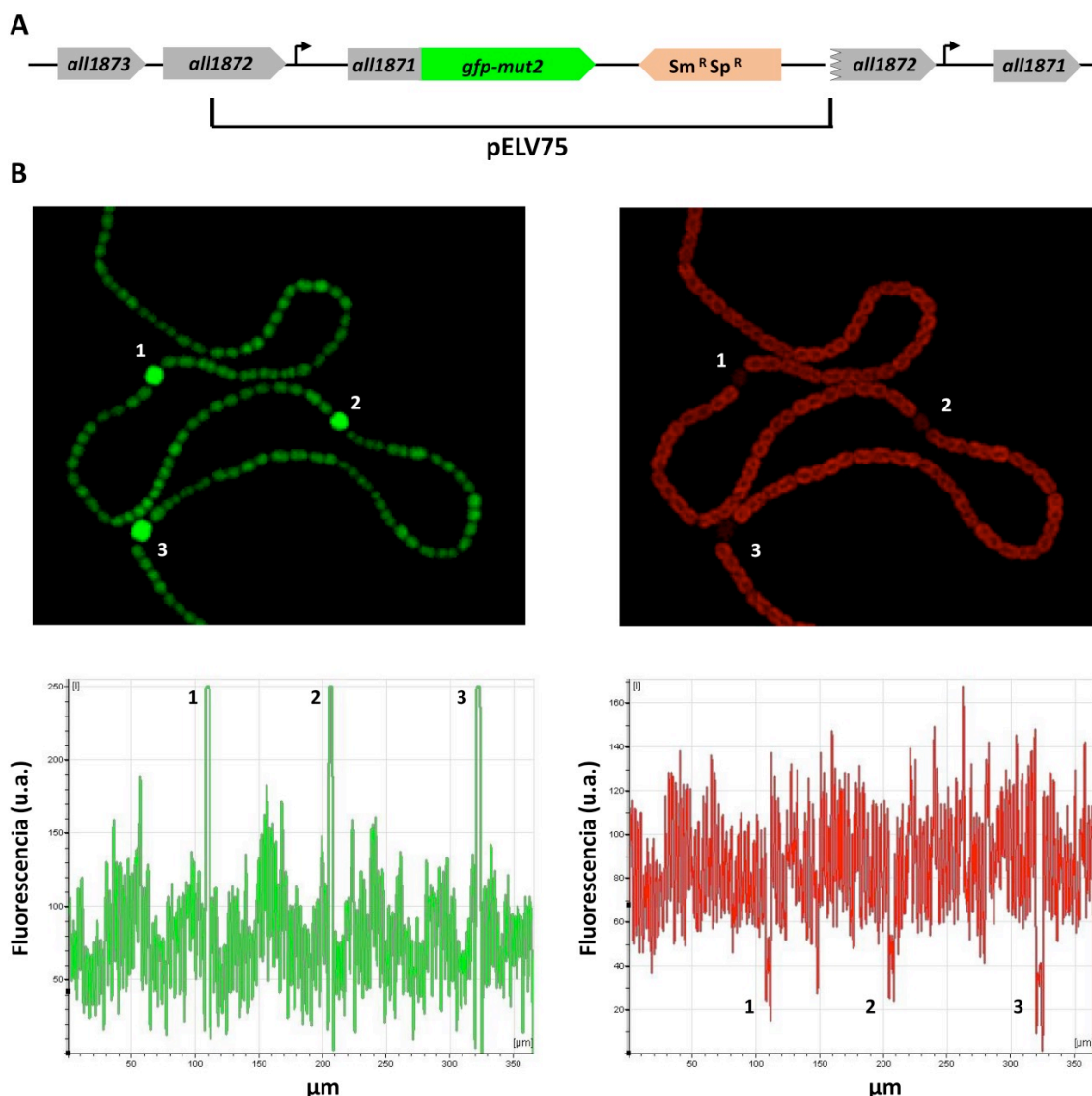


Figura 3.36. Expresión de la fusión traduccional *all1871::gfp* en filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120. **(A)** Representación esquemática de la estructura cromosómica de la estirpe *all1871::gfp* tras la integración del plásmido pELV75 mediante recombinación homóloga en *Nostoc* sp. PCC 7120. **(B)** Imágenes de microscopía confocal de filamentos de la estirpe *all1871::gfp* cultivados en medio sólido durante 5 días en deficiencia de nitrógeno combinado. El panel de la izquierda muestra la fluorescencia de la proteína GFP, mientras que el panel derecho muestra la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos. Debajo de cada panel se muestra la cuantificación de las señales correspondientes a lo largo del filamento. Los heterocistos están indicados (1, 2 y 3).

3.2.7.2. Caracterización de un mutante de *Nostoc* sp. PCC 7120 carente de proteína All1871

Se generó una estirpe mutante del gen *all1871*, *all1871::CK3* (Tabla 2.1), mediante el proceso de doble recombinación por inserción descrito en el apartado 2.2.9.3. Para ello, se introdujo por conjugación (apartado 2.2.9.3) en *Nostoc* sp. PCC 7120 el plásmido replicativo pSAM326 (Tabla 2.3), que contiene la región genómica de *all1871* con la parte central del gen *all1871* delecionada e interrumpida por la inserción de la casete CK3, que confiere resistencia a neomicina (Figura 3.37A). Tras los eventos de doble recombinación, se seleccionaron

exconjugantes resistentes a neomicina, en los que se comprobó la segregación de la mutación mediante PCR (Figura 3.37B). Todos los clones analizados presentaban la banda de 2,2 kb esperada en caso de inserción de la casete. Además, en ninguno de estos clones se amplificó una banda de 0,9 kb, correspondiente al fragmento silvestre, que sí se observó en el caso de *Nostoc* sp. PCC 7120. Estos resultados indican la ausencia de copias silvestres del gen *all1871* en los exconjugantes analizados. La segregación completa de la mutación se confirmó mediante Western blot con el anticuerpo frente a All1871 (Figura 3.37C). El experimento se llevó a cabo con extractos celulares obtenidos de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe *all1871::CK3* establecidos en amonio o transferidos a un medio sin nitrógeno combinado durante 8 horas. Sólo se detectó proteína All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120, lo que indica de nuevo la ausencia de cualquier copia silvestre del gen *all1871* en la estirpe *all1871::CK3*. Este experimento también confirma que la banda de aproximadamente 10 kDa, identificada como All1871 en las Figuras 3.33 y 3.35, corresponde efectivamente a esta proteína.

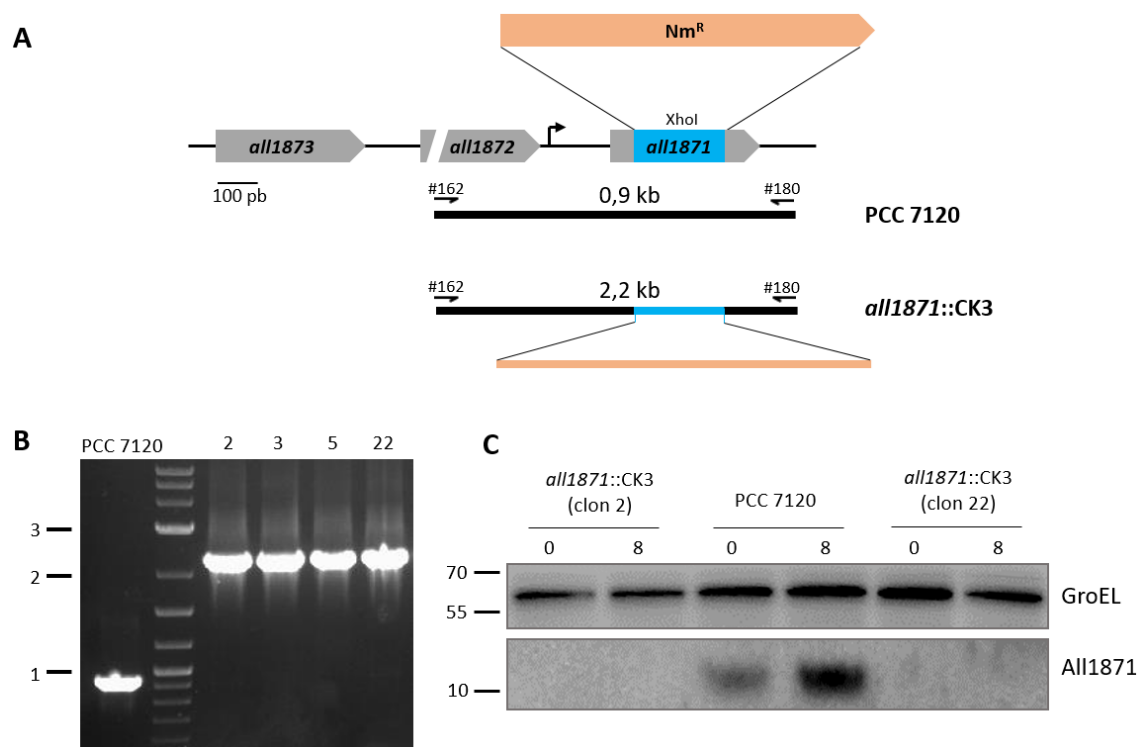


Figura 3.37. Comprobación de la estructura cromosómica de la estirpe *all1871::CK3*. (A) Representación esquemática de la región cromosómica de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante *all1871::CK3*. En azul se muestra la región de *all1871* deletcionada, y en naranja la casete CK3 (confiere resistencia a neomicina) que se inserta en el sitio *XhoI* generado. Se indican con flechas los cebadores empleados en las reacciones de PCR de comprobación de la segregación de la mutación. Además, se indican los tamaños esperados en cada caso. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para la comprobación de la segregación. Como molde se empleó DNA cromosómico de *Nostoc* sp. PCC 7120, o de cuatro clones independientes de la estirpe *all1871::CK3* (clones 2, 3, 5 y 22). A la izquierda se señalan las posiciones del marcador de peso molecular de DNA (en kb). (C) Detección de All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en la estirpe *all1871::CK3*. Western blot con 40 µg de proteína de la fracción soluble de extractos celulares obtenidos de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe *all1871::CK3* (clones 2 y 22) establecidos en amonio (0), y posteriormente transferidos a un medio sin nitrógeno combinado durante 8 horas. El análisis se realizó con anticuerpos generados frente a la proteína All1871 recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 purificada, o con anticuerpos comerciales frente a la proteína GroEL, que se usó como control de carga y transferencia. Los marcadores de tamaño están indicados a la izquierda (en kDa).

Por otro lado, se generó una estirpe en la que se complementa la mutación *all1871::CK3*. Para la generación de esta estirpe, denominada *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* (Tabla 2.1), se introdujo por conjugación (apartado 2.2.9.3) en la estirpe *all1871::CK3* un plásmido que contiene el gen *all1871* bajo el control del promotor *trc* de *E. coli*. Para ello, se utilizó el plásmido pIAE65 (Tabla 2.4), que deriva de pMBA37 (Tabla 2.3), un plásmido disponible en el laboratorio (Brenes-Álvarez, datos no publicados) en el que se clonó el producto de PCR generado con los oligonucleótidos 247 + 735, que corresponde al gen *all1871*. El plásmido resultante, pIAE65 (Figura 3.38), contiene aproximadamente 2 kb de DNA de la región *nucA-nuiA* del plásmido alfa de *Nostoc* sp. PCC 7120, que se utiliza como plataforma para la integración de secuencias de DNA clonadas en los plásmidos derivados de pCSEL24 (Olmedo-Verd *et al.*, 2006).

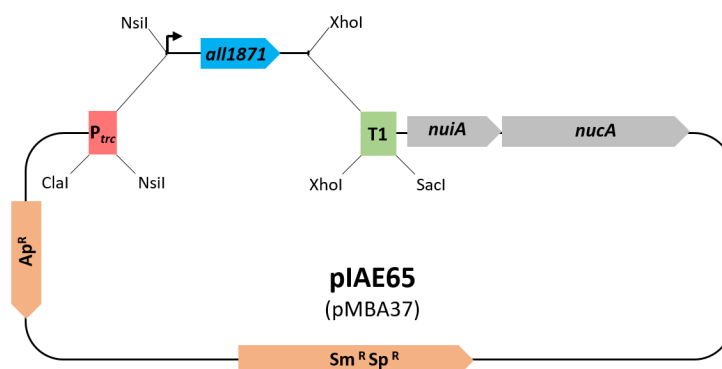


Figura 3.38. Representación esquemática de la construcción del plásmido pIAE65, utilizado para la generación de la estirpe *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*. Se representa el procedimiento seguido para expresar el gen *all1871* bajo el control del promotor *trc*. Se muestra el segmento de DNA (600 pb) amplificado por PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 247 y 735, que generan respectivamente los sitios de restricción NsiI y XhoI en los extremos del fragmento. Dicho segmento comprende desde el TSS de *all1871* (flecha negra) hasta 117 nucleótidos después del codón de parada. Este segmento se clonó entre los sitios NsiI y XhoI del plásmido integrativo pMBA37, que contiene el promotor *trc* (rojo) sin su operador *lac*, y el terminador transcripcional T1 (verde), generando el plásmido pIAE65. Se señalan los sitios de restricción más relevantes, así como los genes de resistencia (naranja), y la región *nucA-nuiA* del plásmido alfa de *Nostoc* sp. PCC 7120 (gris). Los distintos elementos no se muestran a escala.

Se analizó el crecimiento de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* en medio sólido, en condiciones de carencia de nitrógeno combinado o con nitrato como fuente de nitrógeno (Figura 3.39). La estirpe silvestre *Nostoc* sp. PCC 7120 se incluyó como control. Se observa que mientras las tres estirpes tienen un crecimiento similar en medio conteniendo nitrato, la estirpe que carece de All1871, *all1871::CK3*, no crece en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado. La complementación de la mutación restaura la capacidad de crecer en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, si bien las colonias presentan un aspecto más amarillento que la estirpe silvestre. Estos resultados indican que la ausencia de la proteína All1871, cuya acumulación es más elevada en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (véase Figura 3.34), afecta drásticamente a la capacidad de crecer utilizando N₂ como fuente de nitrógeno, una capacidad que requiere el desarrollo de heterocistos funcionales.

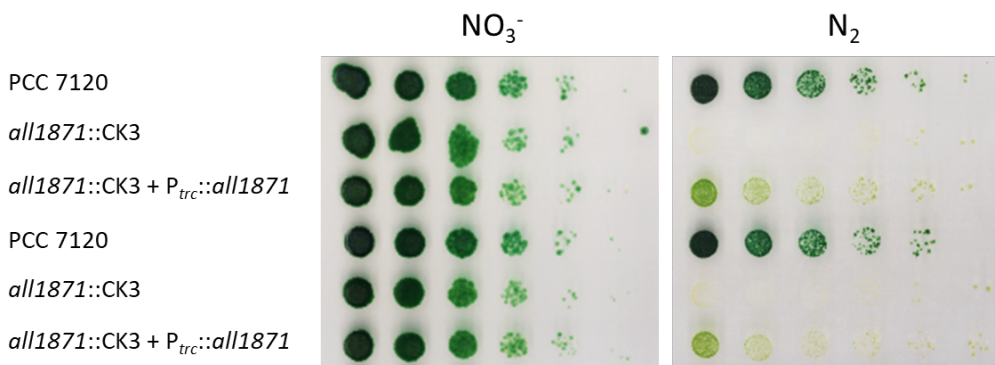


Figura 3.39. Crecimiento de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3* + *P_{trc}::all1871* en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno. Las células procedían de cultivos líquidos en presencia de nitrato. Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en BG11₀ a una absorbancia $A_{750} = 0,3$. A partir de estas suspensiones, se prepararon diluciones seriadas de dos cultivos líquidos de clones independientes de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3* + *P_{trc}::all1871*, así como de dos cultivos líquidos independientes de *Nostoc* sp. PCC 7120, usados como control. Se colocaron 10 μ l de estas suspensiones celulares en medio sólido con nitrato (NO_3^-) como fuente de nitrógeno, o sin nitrógeno combinado (N_2). Las cajas se incubaron a 30°C con luz durante 10 días (NO_3^-) y 13 días (N_2).

Al objeto de comprobar si la estirpe *all1871::CK3* desarrolla heterocistos, se visualizaron al microscopio óptico filamentos de células cultivadas en medio líquido y sometidas a carencia de nitrógeno combinado durante 26 horas (Figura 3.40). La estirpe silvestre *Nostoc* sp. PCC 7120 se incluyó como control. Se observa que tanto la estirpe mutante *all1871::CK3* como la estirpe complementada *all1871::CK3* + *P_{trc}::all1871* muestran diferenciación de heterocistos. Además, la tinción de los heterocistos con azul Alcian indica la deposición en el exterior de los mismos de los polisacáridos característicos de las envueltas de este tipo celular especializado, lo cual indica un estadio avanzado de diferenciación. No obstante, la incubación prolongada de los filamentos de la estirpe *all1871::CK3* en medio líquido sin nitrógeno combinado conduce a una intensa fragmentación de los mismos, con segmentos de 3-5 células como máximo (datos no mostrados), observándose numerosos heterocistos aislados. Al igual que en medio sólido (véase Figura 3.39), no se observa crecimiento de la estirpe *all1871::CK3* en medio líquido en condiciones de carencia de nitrógeno combinado.

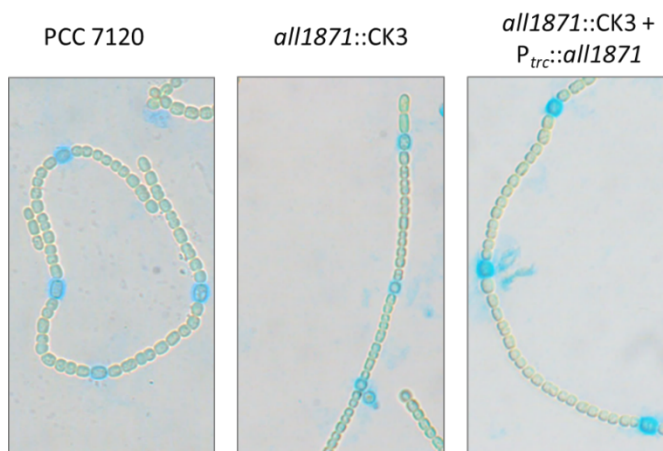


Figura 3.40. Presencia de heterocistos en la estirpe *all1871::CK3*. Fotografías al microscopio óptico de filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes *all1871::CK3* y *all1871::CK3* + *P_{trc}::all1871* cultivadas en medio sólido en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y teñidos con azul Alcian.

Dado que a pesar de diferenciar heterocistos la estirpe *all1871::CK3* no crecía en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, se midió la actividad nitrogenasa de las estirpes *Nostoc* sp. PCC 7120, *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* tanto en condiciones óxicas como anóxicas (Tabla 3.6) mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.7. Como la nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno, la determinación de la actividad nitrogenasa en condiciones anóxicas permite discriminar posibles efectos de un aislamiento deficiente debido a una posible maduración incompleta de las envueltas de los heterocistos. En la Tabla 3.6 se observa que la estirpe *all1871::CK3* no tiene actividad nitrogenasa ni en condiciones óxicas ni en condiciones anóxicas. Por tanto, la ausencia de actividad nitrogenasa no es atribuible únicamente a un posible defecto en el aislamiento de las envueltas de los heterocistos, e indica que los filamentos de esta estirpe carecen de nitrogenasa funcional.

Tabla 3.6. Actividad nitrogenasa de las estirpes *Nostoc* sp. PCC 7120, *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*.

Estirpe	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{mol etileno} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$)	
	Condiciones óxicas	Condiciones anóxicas
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	10,50 \pm 3,49	10,64 \pm 2,05
<i>all1871::CK3</i>	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
<i>all1871::CK3 + P_{trc}::all1871</i>	3,66 \pm 1,67	5,05 \pm 3,41

La actividad nitrogenasa se determinó en ensayos llevados a cabo en condiciones óxicas y anóxicas con células de las estirpes *Nostoc* sp. PCC 7120, *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* procedentes de cultivos establecidos conteniendo nitrato, y posteriormente transferidos durante 24 horas a un medio sin nitrógeno combinado. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de las medidas realizadas con dos cultivos independientes de *Nostoc* sp. PCC 7120, ocho de la estirpe *all1871::CK3*, y dos de la estirpe *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*.

Al objeto de verificar si los heterocistos presentes en la estirpe *all1871::CK3* manifestaban algún defecto en la expresión de los genes del operón *nifHDK*, que determina las subunidades de la nitrogenasa, se analizó su expresión mediante Northern blot en *Nostoc* sp. PCC 7120, y en las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* tras diferentes tiempos en ausencia de nitrógeno combinado (Figura 3.41).

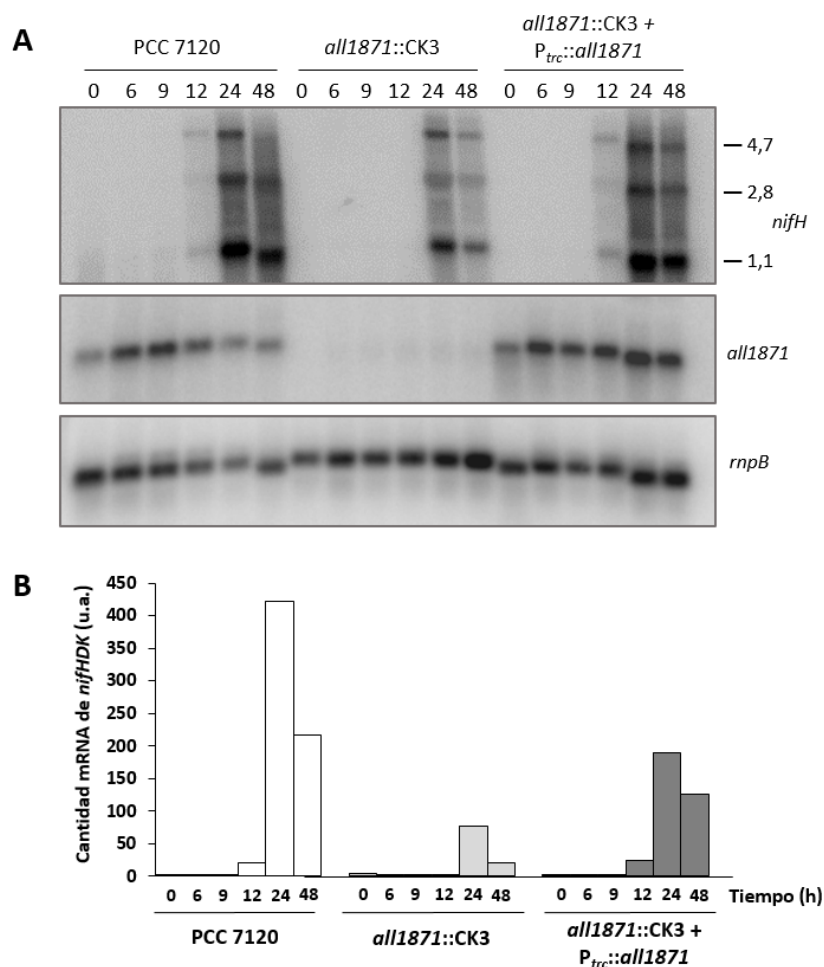


Figura 3.41. Expresión del operón *nifHDK* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y en las estirpes mutantes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*. (A) Northern blot con 8 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* cultivadas en presencia de amonio (0), y posteriormente transferidas a un medio sin nitrógeno combinado durante el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión de los distintos transcritos del operón *nifHDK*: *nifH* (1,1 kb), *nifHD* (2,8 kb) y *nifHDK* (4,7 kb). Se utilizó como sonda un fragmento de 1.231 nt complementario al gen *nifH*, obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 787 y 788. El panel central muestra la expresión del transcrito de *all1871* en la misma membrana. Se utilizó como sonda un fragmento de 197 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 247 y 248. El panel inferior muestra la hibridación de la misma membrana con la sonda para el gen *rnpB* (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. (B) Cuantificación de la acumulación de mRNA del operón *nifHDK*. Se representa la cantidad de transcritos del operón *nifHDK* normalizada por la cantidad de RNA *rnpB* en unidades arbitrarias (u.a.).

En la estirpe *all1871::CK3* se observa un retraso en la inducción de la expresión de los transcritos del operón *nifHDK*, que empiezan a detectarse tras 24 horas en deficiencia de nitrógeno combinado, mientras que en la estirpe silvestre y en la estirpe *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*, los transcritos se detectan desde las 12 horas en condiciones de carencia de nitrógeno combinado. Además, los niveles de expresión de los transcritos del operón *nifHDK* en la estirpe *all1871::CK3* son más bajos que en la estirpe silvestre y en la estirpe *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871*.

3.2.7.3. Expresión de *all1871* en relación con la disponibilidad de carbono

El gen *all1871* está situado aguas abajo de *all1872* y *all1873*, conservándose esta disposición en los genes homólogos de numerosas cianobacterias, sugiriendo una relación funcional entre ellos. El gen homólogo a *all1872* en *Synechocystis* sp. PCC 6803 parece estar relacionado con la disponibilidad de carbono (Jiang *et al.*, 2015). Por ello, se analizó la expresión de *all1871* y de NsrR1 en *Nostoc* sp. PCC 7120 mediante Northern blot con RNA extraído de células cultivadas con burbujeo de aire, es decir, a la concentración de CO₂ atmosférica, o de células cultivadas en un medio suplementado con NaHCO₃ 10 mM y con burbujeo de una mezcla de aire enriquecida con CO₂ al 3% (v/v) durante diferentes tiempos (Figura 3.42).

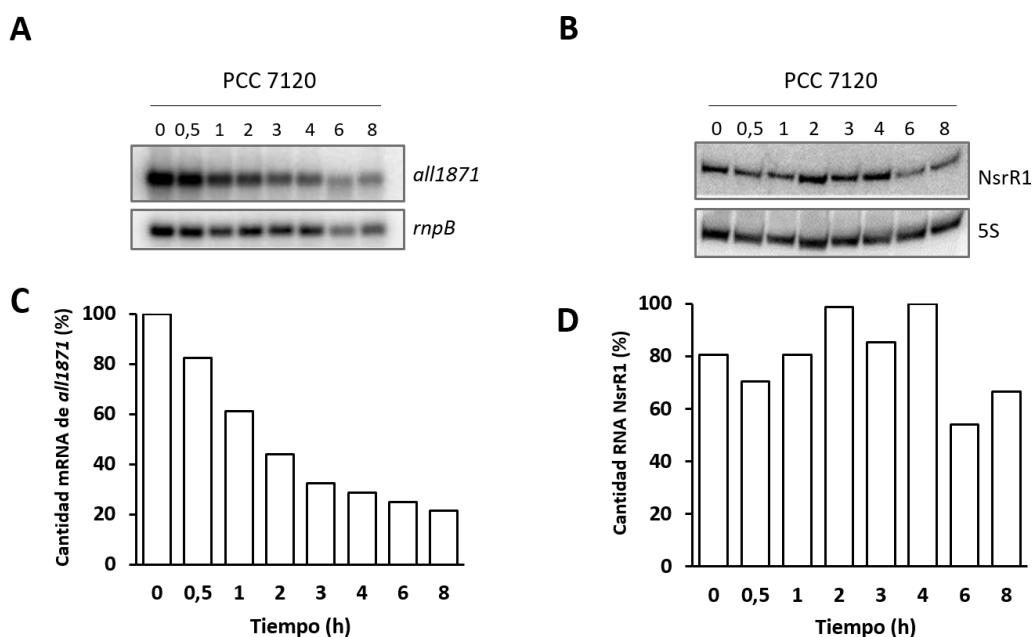


Figura 3.42. Expresión de los transcritos *all1871* y NsrR1 en respuesta a la disponibilidad de carbono en *Nostoc* sp. PCC 7120. (A) Expresión de *all1871*. Northern blot con 5 µg de RNA total procedente de células de *Nostoc* sp. PCC 7120 cultivadas en presencia de amonio con burbujeo de aire (0). Posteriormente se añadió NaHCO₃ 10 mM al medio y se burbujearon con una mezcla de aire enriquecida con CO₂ al 3% (v/v), recogiendo muestras para su análisis tras el número de horas indicado. El panel superior muestra la expresión del transcrito *all1871*. Se utilizó como sonda un fragmento de 197 nt obtenido a partir de un producto de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 247 y 248. El panel inferior muestra la hibridación de esta misma membrana con la sonda para el gen *rnpB*, utilizado como control de carga y transferencia. **(B) Expresión de NsrR1.** Northern blot realizado en las mismas condiciones que en (A). El panel superior muestra la expresión del transcrito NsrR1. Se utilizó como sonda un fragmento de 639 nt (Figura 3.13) obtenido a partir de un producto de PCR generado utilizando como cebadores los oligonucleótidos 158 y 159. El panel inferior muestra la hibridación de esta misma membrana con una sonda complementaria al RNA 5S (Tabla 2.6), utilizado como control de carga y transferencia. **(C-D) Cuantificación de la acumulación de los transcritos *all1871* y NsrR1.** Se representa la cantidad del transcrito de *all1871* (C) o de NsrR1 (D) normalizada respectivamente por la cantidad de *rnpB* (C) o de RNA 5S (D) como porcentaje del máximo. Se muestra un experimento representativo.

Se observa que la expresión de *all1871* es máxima en condiciones limitantes de carbono inorgánico, mientras que se reduce al incrementarse la disponibilidad de carbono. Estos resultados sugieren que *all1871* podría estar implicado en la respuesta al estrés nutricional por limitación de carbono. Con respecto a NsrR1, puede observarse que su expresión no presenta cambios significativos en función de la disponibilidad de carbono.

Se realizaron curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe *all1871::CK3* en medio líquido con burbujeo con aire o con CO₂ al 3% (v/v) (Figura 3.43). En ambos experimentos las células procedían de cultivos previamente establecidos en nitrato, cultivados en medio suplementado con NaHCO₃ 10 mM y burbujeados con una mezcla de aire enriquecida con CO₂ al 3% (v/v).

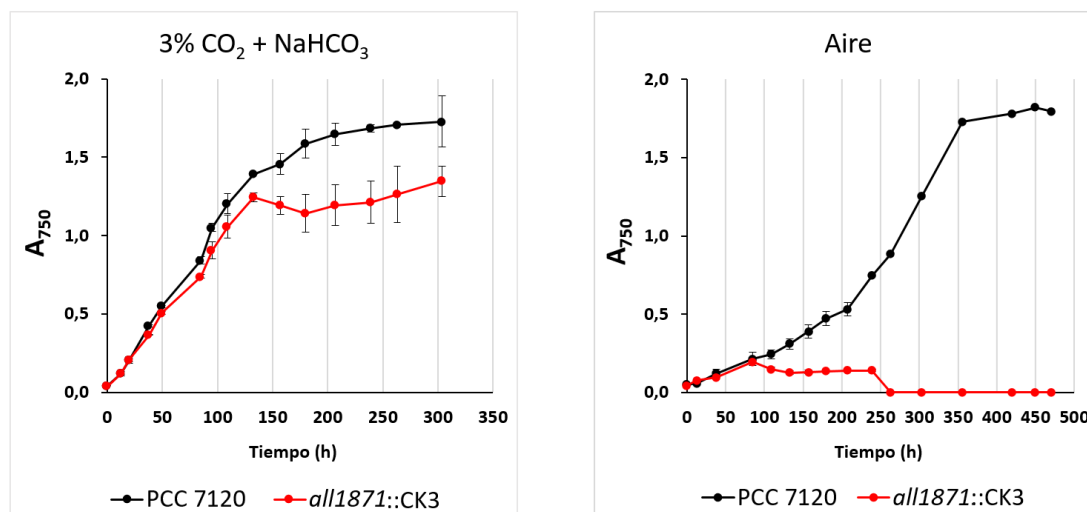


Figura 3.43. Efecto de la disponibilidad de CO₂ en el crecimiento de la estirpe *all1871::CK3*. Curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de la estirpe *all1871::CK3* en medio líquido con burbujeo. A la izquierda se representa el crecimiento en un medio burbujeados con aire enriquecido en CO₂ al 3% (v/v) y suplementado con NaHCO₃ 10 mM. A la derecha se muestra el crecimiento en un medio con burbujeo de aire. En ambos casos se usó nitrato como fuente de nitrógeno. Se analizó el crecimiento de dos cultivos independientes en el caso de la estirpe silvestre, y de dos cultivos independientes en el caso de la estirpe *all1871::CK3*, midiendo la absorbancia a 750 nm (A₇₅₀). (Nota: las medidas que se muestran para la estirpe silvestre en la gráfica de la derecha corresponden a un solo cultivo a partir de la muestra tomada a las 240 horas).

Puede observarse que en condiciones de burbujeo con CO₂ al 3% (v/v) no hay diferencias significativas de crecimiento entre ambas estirpes a lo largo de toda la fase exponencial. Sin embargo, la estirpe *all1871::CK3* alcanza la saturación a una densidad de cultivo menor. Con respecto a los cultivos incubados en aire, además de presentar un crecimiento significativamente más lento que el observado en condiciones de CO₂ al 3% (v/v), se aprecian diferencias de crecimiento significativas entre las dos estirpes, observándose que el cultivo de la estirpe *all1871::CK3* detiene su crecimiento a una densidad celular muy baja, y finalmente las células mueren. Estos resultados vuelven a sugerir que *all1871* jugaría un papel esencial en la adaptación al estrés nutricional por limitación de carbono.

Al objeto de confirmar que la diferencia observada en el crecimiento en condiciones de limitación de carbono es atribuible a la mutación de *all1871*, se repitió la curva de crecimiento en aire incluyendo la estirpe *all1871::CK3* + P_{trc}::*all1871* (Figura 3.44), que complementa la mutación de *all1871*. Puede observarse como la estirpe *all1871::CK3* + P_{trc}::*all1871* presenta una tasa de crecimiento semejante a la de la estirpe silvestre.

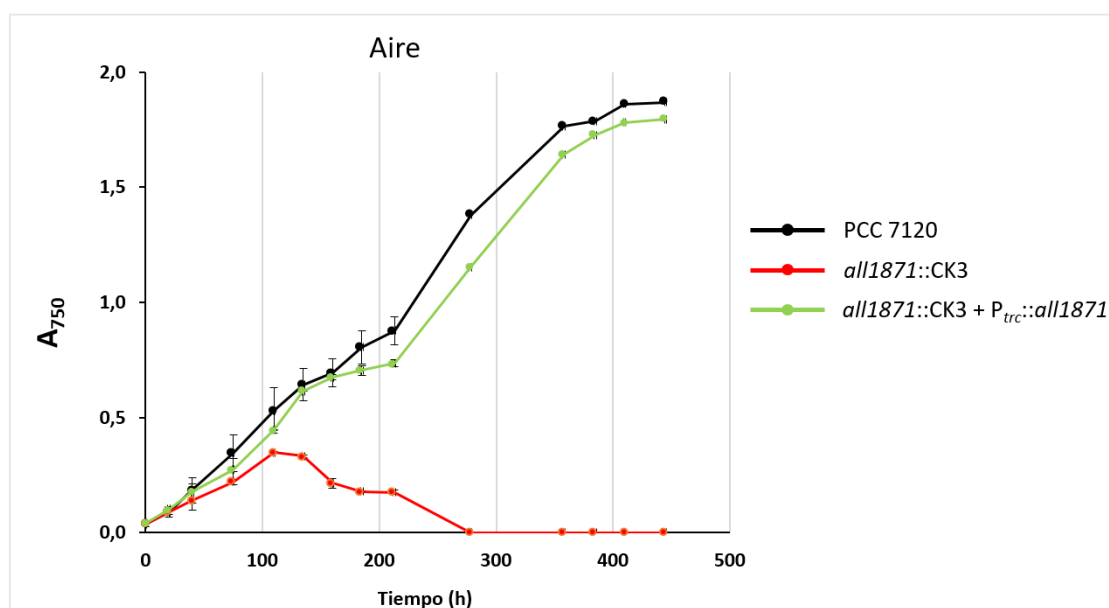


Figura 3.44. Crecimiento de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* en condiciones de limitación de carbono. Curvas de crecimiento de *Nostoc* sp. PCC 7120 y de las estirpes *all1871::CK3* y *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* cultivadas en un medio con burbujeo de aire y con nitrato como fuente de nitrógeno. Se analizó el crecimiento de dos cultivos independientes de cada estirpe, midiendo la absorbancia a 750 nm (A_{750}). (Nota: las medidas que se muestran para la estirpe silvestre y la estirpe *all1871::CK3 + P_{trc}::all1871* corresponden a un solo cultivo a partir de la muestra tomada a las 280 horas).

Todos los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo sugieren que la proteína All1871, además de ser esencial en el proceso de adaptación a la deficiencia de nitrógeno combinado y de estar sometida a una regulación postranscripcional por NsrR1, también jugaría un papel relevante en la adaptación al estrés nutricional por limitación de carbono.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado en la Introducción, los pequeños RNAs reguladores (*small RNAs*, sRNAs) juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica en bacterias. En muchos casos actúan mediando la regulación ejercida por los factores de transcripción clásicos. Así, por ejemplo, en *E. coli* los principales factores de transcripción regulan la expresión de uno o varios RNAs reguladores, que a su vez operan la regulación a nivel postranscripcional de distintos mRNAs. Los factores de transcripción FNR y CRP, los miembros mejor estudiados de la familia CRP/FNR, regulan la expresión de varios sRNAs, como CyaR, cuya transcripción es inducida por CRP (Papenfort *et al.*, 2008; De Lay y Gottesman, 2009), Spot42, cuya transcripción es reprimida por CRP (Beisel y Storz, 2011), o FnrS, cuya transcripción es inducida por FNR (Durand y Storz, 2010). En el contexto de la adaptación a distintas condiciones nitrogenadas, se conocen algunos sRNAs regulados por la disponibilidad de nitrógeno en bacterias. En *Pseudomonas aeruginosa*, el sRNA regulado por nitrógeno NrsZ controla la producción de surfactantes ramnolípidos mediante el control postranscripcional del gen de síntesis de ramnolípidos *rhIA* (Wenner *et al.*, 2014). En condiciones de limitación de nitrógeno, la expresión de NrsZ se induce a través del sistema de dos componentes NtrB/C, que está muy conservado en *Pseudomonas* (Wenner *et al.*, 2014). Otros sRNAs están asociados indirectamente con el metabolismo del nitrógeno. En muchas γ -*proteobacterias* como *E. coli*, GcvB actúa como un factor que afecta al metabolismo del nitrógeno a través de la represión de los transportadores involucrados en la captación de aminoácidos (Sharma *et al.*, 2011).

En cianobacterias, la respuesta a la deficiencia de nitrógeno combinado implica cambios en la expresión de numerosos genes, que están regulados de manera positiva o negativa por el regulador global de la asimilación del nitrógeno NtcA, una proteína de la familia CRP (Herrero *et al.*, 2001). En muchos casos, el mecanismo que subyace a dicha regulación parece ser la activación o represión directa de la expresión génica, como se deduce de la presencia de sitios de unión de NtcA en los promotores de los genes regulados. Sin embargo, en los casos en los que no se pueden identificar elementos de secuencia obvios como responsables de una posible unión directa de NtcA, se asume que el mecanismo de regulación es indirecto. Un posible mecanismo de regulación indirecta por NtcA podría consistir en la participación de RNAs reguladores cuya expresión estuviera regulada por NtcA. Así, por ejemplo, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito un circuito regulador coherente de tipo 4 (Figura 1.6) (Alon, 2007; Nitzan *et al.*, 2017), que implica a NtcA como el regulador principal, y a un sRNA regulado por nitrógeno, NsiR4 (*nitrogen stress induced RNA 4*) (Klähn *et al.*, 2015). En esta estirpe unicelular, NtcA opera directamente la regulación transcripcional de los genes

Discusión

que codifican la glutamina sintetasa y sus factores inactivantes IF7 e IF17 (García-Domínguez *et al.*, 1999), y también regula la transcripción de NsiR4, un sRNA que se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y que modula la traducción de IF7 (Klähn *et al.*, 2015). De esta forma, NsiR4 constituye un nuevo elemento en el esquema de regulación de la actividad glutamina sintetasa, una enzima clave para el control de la asimilación de nitrógeno (Figura 4.1). Esta observación es consistente con las evidencias que se están acumulando en otros sistemas bacterianos en relación con la intervención de sRNAs en los circuitos regulatorios controlados por reguladores transcripcionales de la familia CRP.

De forma similar, también en *Synechocystis* sp. PCC 6803, se ha descrito un circuito que implica a RpaB (Figura 4.1) (Kadowaki *et al.*, 2016), un factor de transcripción que participa en la regulación transcripcional directa de varios genes que codifican proteínas del fotosistema I, y en la regulación de PsrR1 (*photosynthesis regulatory RNA 1*), un sRNA que se reprime a alta intensidad de luz y que regula a nivel postranscripcional la traducción de algunas de estas proteínas relacionadas con el fotosistema I (Georg *et al.*, 2014). Estos lazos regulatorios, así como el que incluye a PmgR1 (*photomixotrophic growth RNA 1*), un sRNA que actúa aguas abajo de PmgA, y que es necesario para el crecimiento fotomixotrófico y la regulación de la acumulación de glucógeno (de Porcellinis *et al.*, 2016), sugieren que al igual que ocurre en otros grupos de bacterias, los sRNAs tienen un papel relevante en la regulación del metabolismo cianobacteriano.

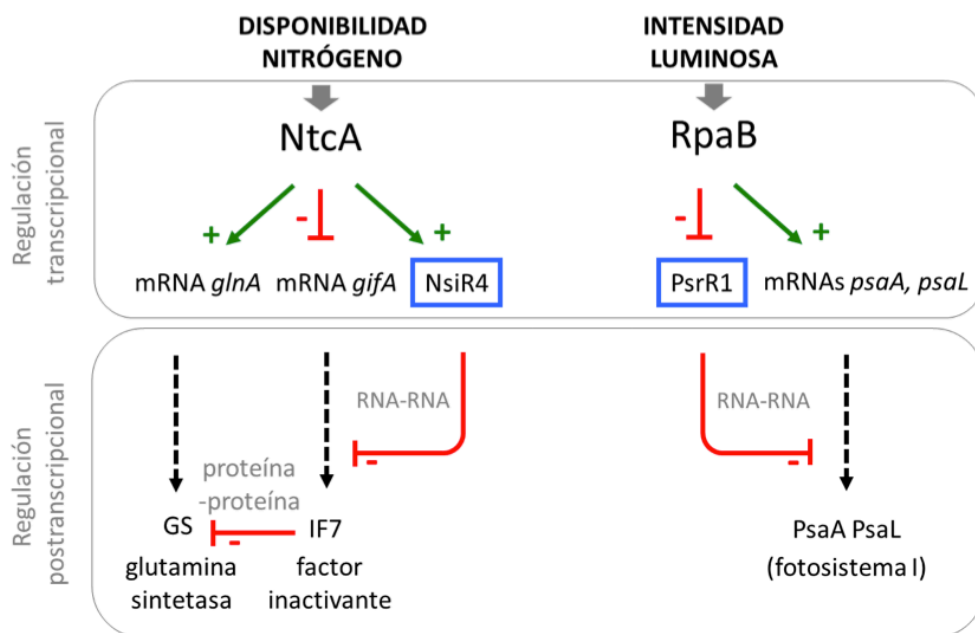


Figura 4.1. Circuitos reguladores coherentes que combinan factores de transcripción y sRNAs en cianobacterias. (Izquierda) Circuito regulador mixto que implica a NtcA como regulador principal, y a NsiR4. Imagen adaptada de (Klähn *et al.*, 2015). (Derecha) Circuito regulador mixto que involucra a RpaB como regulador principal, y a PsrR1. Imagen adaptada de (Kadowaki *et al.*, 2016). Se señalan los eventos de regulación transcripcional (marco superior) y postranscripcional (marco inferior).

Los RNAs reguladores codificados en *trans* son los ribo-reguladores bacterianos mejor caracterizados en lo referente a su biogénesis, función y mecanismo de acción (Storz *et al.*, 2011) aunque todavía son pocos los sRNAs cianobacterianos cuya función se ha estudiado en detalle. Como se ha mencionado, el principal mecanismo de acción de los sRNAs es la regulación postranscripcional de la expresión génica mediante la unión a los mRNAs diana, lo cual puede derivar en la inhibición o la activación de su traducción. Habitualmente, esta interacción tiene lugar cerca o en la propia secuencia de unión del ribosoma, impidiendo la unión del ribosoma y la subsecuente traducción del mRNA, aunque tampoco podría excluirse un efecto más directo sobre la estabilidad del mRNA vía la degradación de éste a través del reclutamiento de RNasas (Figura 1.9).

Los acercamientos globales al análisis de los cambios del transcriptoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado han permitido la identificación de varios sRNAs cuya expresión está controlada por la disponibilidad de nitrógeno (Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). En esta Tesis Doctoral se han caracterizado los sRNAs NsiR3 (*nitrogen stress induced RNA 3*), cuya transcripción es activada por NtcA, y NsrR1 (*nitrogen stress repressed RNA 1*), cuya transcripción es reprimida por NtcA en respuesta a la limitación de nitrógeno combinado en el medio. Además, se han identificado diferentes dianas de la regulación ejercida por estos sRNAs, que estarían implicadas en distintos aspectos del metabolismo cianobacteriano.

4.1. NsiR3, un sRNA inducible en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA

El sRNA NsiR3 había sido identificado en el estudio de dRNA-Seq realizado en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mitschke *et al.*, 2011b), donde además se describía su regulación por nitrógeno en las estirpes CSE2 (mutante *ntcA*) y 216 (mutante *hetR*). El TSS (*Transcription Start Site*) identificado para NsiR3, en la posición 5452083f del cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120, corresponde a un transcrito que se induce significativamente en ausencia de nitrógeno combinado (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b). De hecho, la inducción del transcrito de NsiR3 está entre las respuestas más fuertes a la situación de carencia de nitrógeno combinado (\log_2 fold-change = 5,3) (Mitschke *et al.*, 2011b).

Discusión

La inducción de la transcripción de NsiR3 en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado depende directa y exclusivamente de NtcA, como se deduce del análisis de Northern blot en la estirpe CSE2 (mutante *ntcA*) (Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), lo cual es consistente con los ensayos de retardo de la movilidad electroforética con proteína NtcA purificada realizados en este trabajo (Figura 3.5). En este trabajo se ha identificado un sitio de unión de NtcA conservado y centrado alrededor de la posición -41,5 respecto al TSS de *nsiR3* (Figura 3.4), una posición descrita en varios promotores de Clase II activados por NtcA (Mitschke *et al.*, 2011; Picossi *et al.*, 2014). Además, se observa que en la estirpe 216 (mutante *hetR*), que no diferencia heterocistos, la expresión de NsiR3 en condiciones de carencia de nitrógeno combinado es similar a la observada en la estirpe silvestre, lo que sugiere que este transcrito no es específico de las células en diferenciación, y en principio se estaría transcribiendo en todo el filamento (Mitschke *et al.*, 2011b; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). No obstante, dado que la concentración de NtcA es mayor en los heterocistos (Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Sandh *et al.*, 2014), es de esperar que la transcripción de NsiR3 sea más elevada en este tipo celular.

En contraste con la amplia distribución observada para algunos sRNAs cianobacterianos, como Yfr1 (Voß *et al.*, 2007; Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), los genes que codifican homólogos de NsiR3 sólo se encuentran en los genomas de las cianobacterias formadoras de heterocistos (Figura 3.2) (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), sugiriendo que su posible función podría estar relacionada específicamente con algún rasgo metabólico particular de este grupo de organismos. El alineamiento de las secuencias que codifican homólogos de NsiR3, junto con la predicción de la estructura secundaria de los sRNAs correspondientes, ha permitido la identificación de dos posibles terminadores transcripcionales independientes de Rho en *nsiR3* en *Nostoc* sp. PCC 7120 y otras tres cianobacterias muy cercanas filogenéticamente a la misma (Figura 3.2). De este modo, todas las cianobacterias que contienen NsiR3 presentan una secuencia conservada de aproximadamente 45 pb, mientras que, en cuatro de ellas, la conservación de secuencia se extiende hasta este segundo terminador transcripcional independiente de Rho, lo que daría lugar a un RNA de aproximadamente 100 pb, que es la especie mayoritaria en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Figura 3.3). Cabe resaltar que este segundo terminador está constituido por secuencias STRR (*short tandemly repeated repetitive*) (Figura 3.2), repeticiones imperfectas de 7 nucleótidos que están presentes en numerosas copias en los genomas de cianobacterias filamentosas, generalmente en regiones intergénicas (Mazel *et al.*, 1990; Vioque, 1997). Estas secuencias se han identificado por ejemplo en el RNA

de la RNasa P (*rnpB*) de cianobacterias formadoras de heterocistos, suponiendo una peculiaridad con respecto a la estructura más habitual de la RNasa P bacteriana. En el caso de *rnpB*, las secuencias STRR aumentan la longitud de la hélice P12 de este RNA, aunque se ha demostrado que dichas secuencias no son necesarias para la actividad catalítica *in vitro* de la RNasa P (Vioque, 1997). Las repeticiones STRR parecen haber invadido reciente e independientemente el gen *rnpB* en este grupo de cianobacterias, ya que las estirpes filogenéticamente próximas contienen secuencias STRR no relacionadas. Sin embargo, las repeticiones STRR en NsiR3 son de la misma familia en las tres especies que las contienen (Figura 3.2).

La búsqueda de posibles mRNAs regulados por NsiR3 se llevó a cabo a través de diferentes acercamientos. En primer lugar, se analizaron los datos de un análisis transcriptómico mediante hibridación de *microarrays* (datos no publicados), en el que se compararon los cambios transcripcionales que ocurren tras 8 horas en ausencia de nitrógeno combinado en una estirpe silvestre de *Nostoc* sp. PCC 7120 y una estirpe mutante carente de NsiR3 (Δ *nsiR3*). De este modo, se identificaron siete genes cuyo cambio de expresión tras 8 horas en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado en la estirpe Δ *nsiR3* era significativamente más positivo (o menos negativo) que en la estirpe silvestre, lo que sugería que podrían estar regulados de forma negativa por NsiR3. Además, a partir de una predicción bioinformática con el algoritmo CopraRNA (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014), se seleccionaron también varios candidatos adicionales a interactuar con NsiR3. Finalmente, se identificaron los genes *alr2431* y *putA* al detectar una alta correlación negativa con NsiR3 en su patrón de expresión en un análisis de coexpresión realizado en nuestro laboratorio (Brenes-Álvarez, datos no publicados). En todos los casos, se analizaron las interacciones entre estos posibles mRNAs diana y NsiR3 mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli* descrito en el apartado 2.6 (Urban y Vogel, 2007). El sistema heterólogo para la validación de interacciones en *E. coli* tiene, en el caso de interacciones entre RNAs de organismos filogenéticamente distantes de las enterobacterias, algunos prerequisites que afectan a la viabilidad de su uso. Así, se estima que sólo el 30% de los mRNAs cianobacterianos se traducen en *E. coli* (Dr. Wolfgang R. Hess, comunicación personal). Este aspecto, así como la posibilidad de que ciertas interacciones requieran de algún elemento adicional en la cianobacteria, que no estaría presente en el sistema heterólogo, restringen las posibilidades de validación en *E. coli*. No obstante, en este trabajo se ha utilizado con éxito este sistema para la validación de diversas interacciones sRNA-mRNA.

4.1.1. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120

La posible interacción entre NsiR3 y el mRNA de *alr2431* se confirmó mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli*, donde se observa que la expresión de NsiR3 provoca una reducción en los niveles de fluorescencia GFP de las células portadoras de la fusión traduccional *alr2431-sfgfp* con respecto a las células control en las que no se expresa NsiR3 (Figura 3.8). Mediante el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) se predice la posible formación de un dúplex perfecto entre los nucleótidos -46 y -56 (con respecto al codón de inicio de la traducción) de la región 5'UTR del mRNA de *alr2431*, y los nucleótidos 7 a 17 de NsiR3 (Figura 3.7). Esta predicción se ve apoyada por los resultados obtenidos al utilizar RNAs con mutaciones puntuales realizadas en la posición 14 de NsiR3 o en la posición -53 de la región 5'UTR de *alr2431*, que eliminan la reducción en los niveles de fluorescencia GFP observada en el caso de interacción entre los RNAs silvestres (Figura 3.9). Sin embargo, sorprendentemente, cuando se combinan ambas mutaciones, lo que teóricamente permitiría restaurar la interacción predicha entre ambos nucleótidos, no se recupera el efecto inhibitorio que produce la expresión de NsiR3 en la fusión traduccional *alr2431-sfgfp* (Figura 3.9). Esto podría indicar que, aunque los nucleótidos -53 del mRNA y 14 de NsiR3 estén involucrados en la interacción, ésta no implica un apareamiento directo entre ellos. Cabe destacar que la interacción predicha por IntaRNA entre NsiR3 y la región 5'UTR del mRNA de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120 no está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen NsiR3. De hecho, *alr2431* no apareció como una de las posibles dianas de NsiR3 en el análisis de CopraRNA (Tabla 3.1), un acercamiento que tiene en cuenta la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas, sino que fue seleccionado para su estudio exclusivamente en base al análisis de la red de coexpresión disponible en el laboratorio.

En este trabajo se demuestra que la alteración de los niveles de NsiR3 afecta a la acumulación del mRNA de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120. En los análisis de Northern blot (Figura 3.10) se observa una reducción acusada en la acumulación del transcrito de *alr2431* en la estirpe que sobreexpresa NsiR3, $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$, mientras que en la estirpe que carece de este sRNA, $\Delta nsiR3$, no se aprecia la represión que se produce en este transcrito en la estirpe silvestre cuando se retira el nitrógeno combinado del medio. Estos resultados sugieren que NsiR3 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *alr2431* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Como se ha comentado, Alr2431 es una proteína de función desconocida, por lo que se ignora el papel específico que NsiR3 jugaría en el metabolismo de

Nostoc sp. PCC 7120 a través de la regulación de esta proteína. En cualquier caso, la expresión del transcrito de *alr2431* se reprime en ausencia de nitrógeno combinado (Figura 3.10), presentando una dinámica de expresión complementaria a la observada en NsiR3, lo que podría sugerir que la proteína Alr2431 estuviera de alguna forma relacionada con el metabolismo del nitrógeno.

4.1.2. Efecto de NsiR3 sobre la expresión de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Al igual que en el caso de *alr2431*, la posible interacción entre NsiR3 y la región 5'UTR del gen *putA* se confirmó mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli*, donde se observa que la expresión de NsiR3 provoca una reducción en los niveles de fluorescencia GFP de la fusión traduccional *putA::sfGFP* con respecto al control que no expresa NsiR3 (Figura 3.8). Mediante el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) se predice una posible interacción entre los nucleótidos -5 y -17 (con respecto al codón de inicio de la traducción) de la región 5'UTR de *putA*, y los nucleótidos 1 a 14 de NsiR3, que formarían una hélice imperfecta (Figura 3.7). Esta predicción se ve apoyada por los resultados obtenidos al utilizar RNAs con mutaciones puntuales realizadas en la posición 14 de NsiR3 o en la posición -17 de la región 5'UTR de *putA*, que eliminan la reducción en los niveles de fluorescencia GFP observada en el caso de la interacción entre los RNAs silvestres (Figura 3.9). Cuando se combinan ambas mutaciones, lo que restauraría la interacción, se recupera el efecto inhibitorio que produce la expresión de NsiR3 en la fusión traduccional *putA::sfGFP* (Figura 3.9), confirmándose que los nucleótidos en las posiciones 14 de NsiR3 y -17 del mRNA de *putA* están implicados en la interacción apareando entre ellos. Cabe recordar que la identificación de *putA* se basó únicamente en el análisis de la red de coexpresión disponible en el laboratorio, y que este mRNA diana no apareció en el análisis de CopraRNA (Tabla 3.1), lo cual no es sorprendente, ya que la interacción predicha por el algoritmo IntaRNA entre NsiR3 y la región 5'UTR del mRNA de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120 no está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen este sRNA.

En este trabajo se ha demostrado que NsiR3 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *putA* en *Nostoc* sp. PCC 7120. En los análisis de Northern blot se observa una reducción acusada en la acumulación del transcrito de *putA* en la estirpe que sobreexpresa NsiR3, $\Delta nsiR3 + P_{petE}::nsiR3$, mientras que en la estirpe que carece de este sRNA, $\Delta nsiR3$, no se aprecia esta reducción (Figura 3.12).

Discusión

Como ya se ha comentado, NsiR3 es un sRNA cuya expresión se induce en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado. Por otro lado, la presencia del gen *nsiR3* está restringida a los genomas de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. Por ello, cabe plantearse qué papel jugar la inhibición de PutA por NsiR3 en el contexto del metabolismo diazotrófico en el que conviven e intercambian metabolitos células vegetativas y heterocistos (Figura 4.2). La proteína PutA es una prolina oxidasa bifuncional que convierte prolina en glutamato vía Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato/glutamato- γ -semialdehído mediante las actividades prolina deshidrogenasa y pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (Liu *et al.*, 2017). Esta proteína juega un importante papel en el catabolismo de la arginina, pues este aminoácido se convierte en prolina mediante AgrE, una enzima bifuncional recientemente caracterizada (Burnat *et al.*, 2019), que convierte arginina en prolina vía ornitina mediante sus actividades arginina dihidrolasa y ornitina ciclodeaminasa. Por tanto, PutA es requerida para la conversión de arginina en glutamato. En los filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120 creciendo en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, el NH_4^+ proporcionado por la nitrogenasa de los heterocistos a partir del N_2 atmosférico se incorpora rápidamente en glutamina por acción de la glutamina sintetasa (GS). Dado que los heterocistos carecen de glutamato sintasa (GOGAT) (Thomas *et al.*, 1977; Martín-Figueroa *et al.*, 2000), la conversión de glutamina en glutamato ocurre en las células vegetativas, que proporcionan glutamato a los heterocistos (Thomas *et al.*, 1977). La glutamina no es la única fuente de nitrógeno que los heterocistos suministran a las células vegetativas, pues los gránulos de cianoficina, un polímero de arginina y aspartato, son una fuente de estos aminoácidos para las células vegetativas. En los heterocistos, la cianoficinasasa hidroliza la cianoficina generando el dipéptido β -aspartil-arginina, que es transportado a las células vegetativas, donde es hidrolizado por la isoaspartil dipeptidasa para generar aspartato y arginina (Burnat y Flores, 2014).

El mRNA correspondiente a *putA* no se detecta en los heterocistos (Burnat *et al.*, 2019), y AgrE se expresa mayoritariamente en las células vegetativas (Burnat *et al.*, 2019). Los mecanismos por los que el mRNA de *putA* no se expresa en los heterocistos siguen siendo desconocidos. En este trabajo se ha demostrado que la expresión elevada de NsiR3 provoca una reducción significativa de la acumulación del mRNA de *putA*. Como ya se ha discutido, dada su dependencia de NtcA, cuya concentración es mayor en los heterocistos (Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Sandh *et al.*, 2014), se espera que la expresión de NsiR3 sea significativamente mayor en este tipo celular que en las células vegetativas. Por tanto, NsiR3 podría ser el responsable único o en colaboración con otros mecanismos regulatorios de la ausencia del mRNA de *putA* en los heterocistos. Por otro lado, se desconoce si los niveles de NsiR3 en las células vegetativas son lo suficientemente elevados como para afectar significativamente a la expresión de PutA. Se puede especular que en las células vegetativas NsiR3 podría jugar un papel en el control del flujo metabólico desde la arginina hacia el glutamato, por ejemplo, para evitar una reducción excesiva de la concentración de prolina por la demanda del transporte de glutamato al heterocisto.

4.2. NsrR1, un sRNA reprimible en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y regulado por NtcA

En el estudio de los datos obtenidos a partir de los acercamientos globales al análisis de los cambios del transcriptoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado, se identificó un TSS en la posición 2050703f del cromosoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 que corresponde a un transcrito que se reprime significativamente en estas condiciones (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b) (\log_2 fold-change = -2,1) (Mitschke *et al.*, 2011b). Asimismo, en (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016) se realizó un estudio en el que se predijo la existencia de un sRNA que se transcribiría desde dicho TSS hasta la posición 2050814f, precedida por un terminador independiente de Rho.

La represión de la transcripción de NsrR1 en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado es operada, al menos parcialmente, por NtcA, como se deduce del análisis de Northern blot en la estirpe CSE2 (mutante *ntcA*) (Figura 3.15), y de los ensayos de retardo de la movilidad electroforética con la proteína NtcA purificada (Figura 3.18). Además, en el análisis de Northern blot también se observa que en la estirpe 216 (mutante *hetR*), que no diferencia heterocistos, la expresión de NsrR1 en estas condiciones es similar a la observada en la estirpe silvestre, lo que indica que este transcrito no es específico de las células en diferenciación, sino que en principio se estaría transcribiendo en todo el filamento. Si bien, es de esperar que, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, la represión de la transcripción de NsrR1 sea mayor en los heterocistos, donde la concentración de NtcA es más elevada (Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Sandh *et al.*, 2014).

En este trabajo se ha identificado un sitio de unión de NtcA conservado y centrado en la posición -16,5 respecto al TSS de *nsrR1* (Figura 3.17), por lo que la unión de NtcA al promotor de *nsrR1* interferiría con la unión de la RNA polimerasa. Esta posición es compatible con un efecto represor de la unión de NtcA, y similar a la descrita en otros promotores reprimidos por NtcA (Ramasubramanian *et al.*, 1994; Galmozzi *et al.*, 2010; Muro-Pastor *et al.*, 2017) (Figura 4.3).

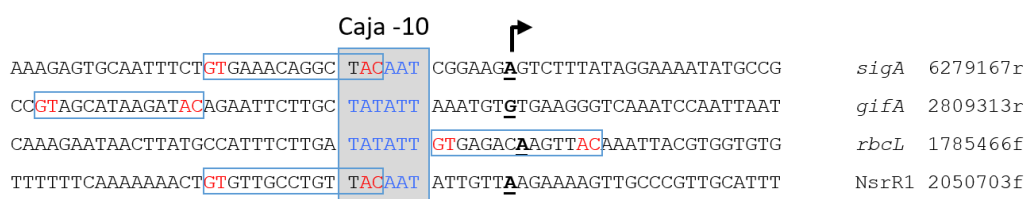


Figura 4.3. Sitios de unión de NtcA en algunos promotores reprimidos por NtcA. Se muestra el promotor de *nsrR1* junto con los promotores reprimidos por NtcA de *sigA* (Muro-Pastor *et al.*, 2017), *gifA* (Galmozzi *et al.*, 2010) y *rbcL* (Ramasubramanian *et al.*, 1994). Para cada uno de ellos se indica a la derecha la posición del correspondiente TSS. Los promotores se alinearon con respecto a la posible caja -10, señalada con un cuadro gris. Los TSS (Mitschke *et al.*, 2011b), señalados con una flecha negra, se resaltan en negrita y subrayados. Los posibles sitios de unión de NtcA están enmarcados en azul, indicándose en rojo los nucleótidos conservados dentro del motivo de unión de NtcA (GTN₁₀AC) definido en (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014; Giner-Lamia *et al.*, 2017).

La observación de que la represión de la transcripción de NsrR1 por NtcA sea solo parcial sugiere la participación de algún otro regulador o reguladores que podrían integrar señales diferentes a la de carencia de nitrógeno. En este contexto, la expresión de NsrR1 podría estar regulada adicionalmente por otro represor. La conservación de una T inmediatamente aguas arriba de la secuencia consenso de unión de NtcA, GTN₁₀AC (Mitschke *et al.*, 2011b; Picossi *et al.*, 2014; Giner-Lamia *et al.*, 2017), sugiere la posible unión de un regulador no identificado similar a CRP (Forcada-Nadal *et al.*, 2014). Cabe resaltar la observación de que las secuencias del sitio de unión de NtcA en las regiones promotoras de los genes que codifican homólogos de NsrR1 (un sitio represor, Figura 3.17), y NsiR3 (un sitio activador, Figura 3.4), están muy conservadas, siendo en la mayoría de los casos GTGN₈TAC. La secuencia concreta del sitio de unión de NtcA podrían modular la eficiencia de la interacción de NtcA con las regiones promotoras de estos sRNAs, la dependencia de 2-oxoglutarato u otros elementos adicionales relacionados con la regulación por NtcA, lo que podría contribuir a la regulación específica de los niveles de ambos sRNAs. Al igual que en el caso de NsiR3, los genes que codifican homólogos de NsrR1 sólo se encuentran en los genomas de las cianobacterias formadoras de heterocistos, y en dos estirpes unicelulares filogenéticamente próximas (Figura 3.14) (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016), sugiriendo que su función podría estar relacionada específicamente con algún rasgo metabólico particular en este grupo de organismos.

A partir de la aplicación del algoritmo CopraRNA se obtuvieron varios posibles mRNAs candidatos a interactuar con NsrR1, de los que se seleccionaron cinco, cuatro de ellos relacionados con el proceso de degradación de los ficobilisomas (Tabla 3.4). Estos candidatos se analizaron mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli* (Figura 3.20), validándose la interacción entre NsrR1 y dos de ellos, *nbIA* (Figura 3.21) y *all1871* (Figura 3.29), sobre los que se discutirá a continuación.

4.2.1. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de *nbIA* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Los ficobilisomas representan una gran cantidad de la proteína total, y por tanto del nitrógeno, en las células cianobacterianas. En las cianobacterias incapaces de fijar nitrógeno atmosférico, el reciclaje de los aminoácidos de las ficobiliproteínas orquestado por NblA es una respuesta adaptativa a la carencia de nitrógeno combinado. Por su parte, en las cianobacterias formadoras de heterocistos, que en última instancia son capaces de superar la deficiencia de nitrógeno combinado mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, el grado de degradación de los ficobilisomas es mucho menor que en las estirpes unicelulares (Maldener *et al.*, 1991; Baier *et al.*, 2004), aunque la transcripción de *nbIA* se induce como una respuesta transitoria a la ausencia de nitrógeno combinado.

Discusión

Mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli* se ha demostrado una interacción directa entre NsrR1 y la región 5'UTR de *nblA* en la zona predicha por el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), que deriva en una expresión reducida de la fusión traduccional *nblA::sfGFP* en presencia de NsrR1 con respecto a las células control en las que no se expresa este sRNA (Figura 3.21). Esta interacción, que comprendería los nucleótidos -14 a -23 (con respecto al codón de inicio de la traducción) de la región 5'UTR de *nblA*, y los nucleótidos 59 a 68 de NsrR1, se ha confirmado además en ensayos de protección *in vitro* frente a la degradación por RNasas o acetato de plomo (Figura 3.22).

Aunque los anticuerpos generados frente a la proteína NblA recombinante de *Nostoc* sp. PCC 7120 detectan específicamente NblA en extractos celulares de *E. coli* que sobreexpresan esta proteína (Figura 3.27), no ha sido posible detectar la proteína NblA con estos anticuerpos en extractos de *Nostoc* sp. PCC 7120. Así mismo, se ha intentado detectar NblA con anticuerpos comerciales frente a polihistidinas o frente a la proteína GFP en extractos de estirpes de *Nostoc* sp. PCC 7120 en las que la proteína NblA se traduce en fase con una etiqueta de histidinas o con la proteína GFP respectivamente, sin que ninguna de estas estrategias permitiera detectar la proteína NblA en extractos de *Nostoc* sp. PCC 7120 (datos no mostrados). Esto podría deberse a los bajos niveles de proteína NblA existentes en las células cianobacterianas, lo que dificultaría su detección con anticuerpos. De hecho, se ha sugerido que NblA es degradada por la maquinaria de degradación celular en el marco de la interacción que promueve entre la proteasa Clp y las ficobiliproteínas (Baier *et al.*, 2014; Sendersky *et al.*, 2014). Aunque no se han podido evaluar de forma directa los efectos de la sobreexpresión de NsrR1 en la acumulación NblA sí se ha podido demostrar una reducción en la acumulación de los transcritos de *nblA* en la estirpe de *Nostoc* sp. PCC 7120 que sobreexpresa NsrR1, $\Delta nsrR1 + P_{petE}::nsrR1$ (Figura 3.26). Estos resultados sugieren que NsrR1 tiene un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *nblA* en *Nostoc* sp. PCC 7120, y que este efecto podría ser una consecuencia de la interacción entre estas dos moléculas de RNA, que conduciría a una traducción reducida de NblA en presencia de NsrR1. La interacción entre NsrR1 y el mRNA de *nblA* ocurre cerca del inicio de la traducción y, por lo tanto, afecta a las regiones 5'UTR de los cinco posibles transcritos de *nblA* (Mitschke *et al.*, 2011). De este modo, aunque la regulación transcripcional de *nblA* pudiera estar operada por distintos reguladores que integren señales diferentes, tales como la disponibilidad de azufre o cambios en la longitud de onda de la luz (Luque *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2003), todos los transcritos de *nblA* serían susceptibles a una regulación postranscripcional adicional ejercida por NsrR1, y, por lo tanto, la acumulación de la proteína NblA estaría en última instancia bajo el control de la disponibilidad de nitrógeno combinado.

Los niveles de NsrR1 presentes en las células durante el crecimiento en presencia de amonio (Figura 3.15) suprimirían la traducción basal de *nbIA*, reduciendo de este modo al mínimo la producción de proteína NblA, que tendría consecuencias indeseables sobre la estabilidad de los ficobilisomas en condiciones de disponibilidad de nitrógeno. De hecho, los análisis de dRNA-Seq y de extensión del cebador (Mitschke *et al.*, 2011) indican una transcripción basal de los transcritos 2, 4 y 5 de *nbIA* en presencia de amonio, no detectable en análisis de Northern blot (Figura 3.25), que son menos sensibles. Por otro lado, se ha demostrado que otra proteína involucrada directamente en la degradación de los ficobilisomas, NblB, está presente en condiciones de suficiencia de nitrógeno en *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 (Levi *et al.*, 2018). Los datos de RNA-Seq disponibles en *Nostoc* sp. PCC 7120 (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b) sugieren que, en este organismo, *nbIB* también se expresa de manera constitutiva. Por lo tanto, parece de suma importancia evitar cualquier acumulación basal de NblA, que junto con la presencia de NblB, comprometerían la estabilidad de los ficobilisomas en condiciones de suficiencia de nitrógeno. Además, la presencia de NsrR1 en estas condiciones conduciría a un retraso en la producción de NblA tras la inducción, a través de NtcA (Figura 3.25), de la transcripción de *nbIA* (Levine y Hwa, 2008), retrasando el inicio de la degradación de los ficobilisomas, y proporcionando estabilidad al evitar una respuesta ante condiciones ambientales fluctuantes. La degradación controlada de los ficobilisomas, aunque no es esencial para la adaptación a la deficiencia transitoria de nitrógeno en las cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, podría ser una ventaja en entornos naturales sujetos a cambios en diferentes factores como la intensidad de la luz o la disponibilidad de otros nutrientes. Esta fina regulación en el proceso de degradación de los ficobilisomas evitaría la degradación de los mismos cuando no es estrictamente necesario, ya que el proceso de degradación es irreversible, y la generación *de novo* de estas estructuras implica un alto coste energético para la célula. Adicionalmente, se ha descrito también la existencia de un RNA antisentido de *nbIA* que se acumula en condiciones de suficiencia de nitrógeno (Flaherty *et al.*, 2011). Este asRNA podría tener un efecto adicional al de NsrR1, contribuyendo a minimizar la expresión de NblA en estas condiciones. La presencia de dos RNAs potencialmente inhibitorios de la expresión de *nbIA*, NsrR1 y el RNA antisentido mencionado, podría sugerir que es esencial bloquear al completo la producción de la proteína NblA en condiciones de suficiencia de nitrógeno.

Discusión

Los cambios detectados en el contenido de los pigmentos celulares entre *Nostoc* sp. PCC 7120 y la estirpe $\Delta nsrR1$ son consistentes con la represión de la acumulación de NblA por NsrR1 propuesta, así como con el modelo de regulación sugerido (Figura 4.4). La observación de que en presencia de amonio la ratio ficocianina/clorofila es ligeramente menor en la estirpe $\Delta nsrR1$ que en la estirpe silvestre (Figura 3.28), sugiere que la expresión basal de *nblA* en ausencia de NsrR1 derivaría en una estabilidad reducida de las ficobilinas. Tras 48 horas en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado los heterocistos son completamente funcionales, y se revierte la situación de carencia de nitrógeno combinado. De hecho, en las células de *Nostoc* sp. PCC 7120, la proporción de ficocianina/clorofila se estabiliza en estas condiciones, mientras que en la estirpe $\Delta nsrR1$ disminuye aún más, lo que sugiere una presencia prolongada de NblA en ausencia de NsrR1.

El modelo de regulación propuesto (Figura 4.4) corresponde a un circuito regulador coherente de tipo 4 (Figura 1.6) (Alon, 2007; Nitzan *et al.*, 2017). Este tipo de circuito, en el que un factor de transcripción es el regulador principal, provoca un retraso en la acumulación de la proteína diana (NblA en este caso) cuando se activa dicho factor de transcripción (NtcA en este caso), y una disminución acelerada de la traducción de la proteína diana cuando el factor de transcripción está inactivo (Beisel y Storz, 2011). La regulación dual a nivel transcripcional y postranscripcional proporciona un control estricto de los niveles de NblA. Además, debido a que el regulador superior, NtcA, está sujeto a una acumulación diferencial en los heterocistos (Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Sandh *et al.*, 2014), el circuito regulador está probablemente reforzado en este tipo celular con respecto a las células vegetativas. De este modo, los niveles elevados de NtcA en los heterocistos podrían promover una transcripción más fuerte de *nblA*. La combinación del aumento de la transcripción de *nblA* con los bajos niveles de NsrR1, que afectan a la traducción de la proteína NblA, conduciría a un aumento de la acumulación de esta proteína, produciendo una degradación de los ficobilisomas más rápida específicamente en los heterocistos en desarrollo.

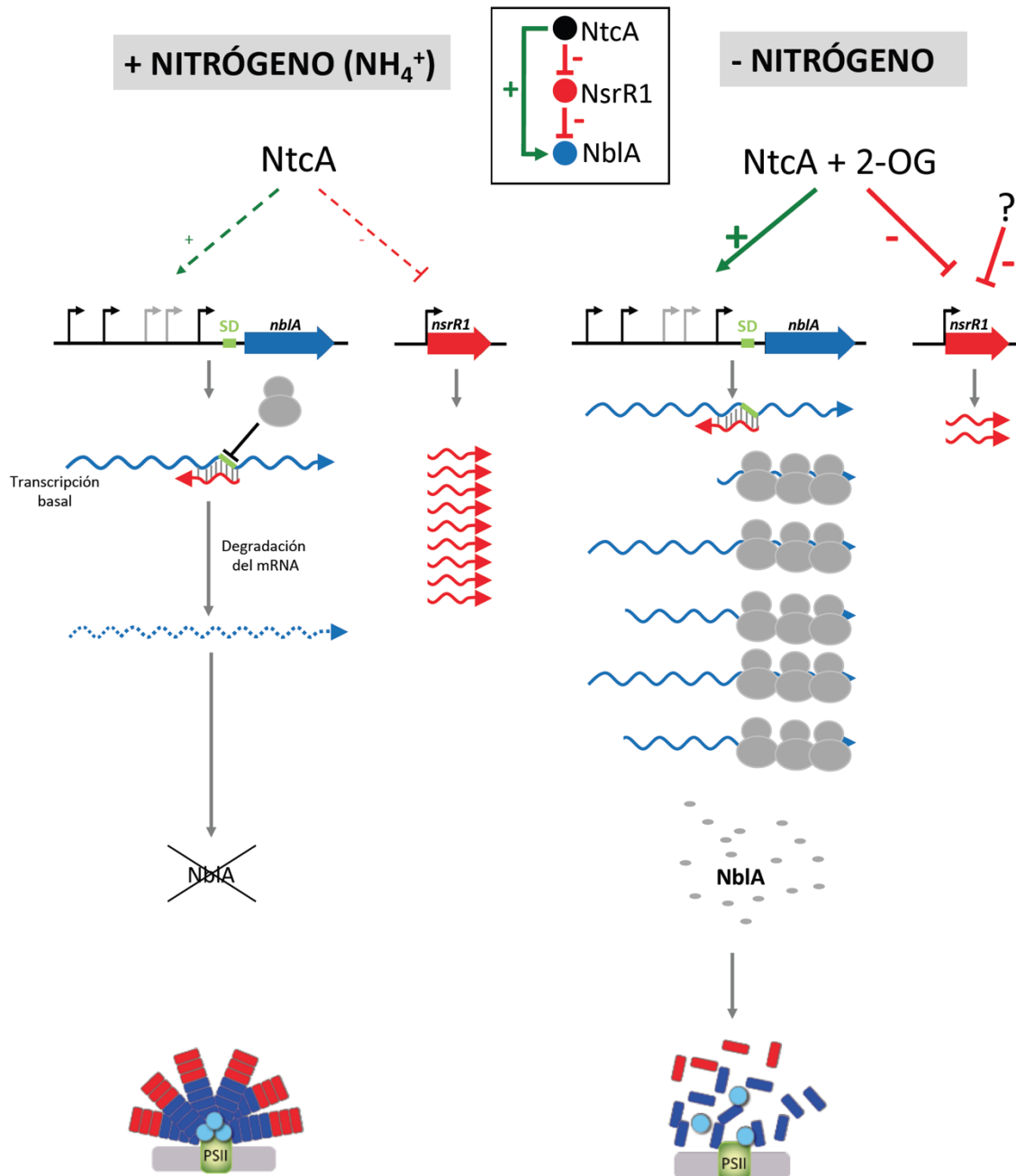


Figura 4.4. Modelo propuesto para la función de NsrR1 en la regulación de *nblA*. (Izquierda) En condiciones de suficiencia de nitrógeno, la concentración intracelular de 2-oxoglutarato (2-OG) es baja, y NtcA no activa la transcripción de *nblA*, ni reprime la de *nsrR1*, que se expresa a altos niveles. Por lo tanto, en estas condiciones hay un exceso de NsrR1 con respecto a cualquier pequeña cantidad de mRNA de *nblA* que pudiera estar presente debido a su transcripción basal. La unión de NsrR1 a los transcritos de *nblA* resultaría en la degradación del mRNA, evitando la producción de proteína NblA, y en consecuencia la degradación de los ficobilisomas en condiciones de suficiencia de nitrógeno. (Derecha) En condiciones de limitación de nitrógeno combinado, la concentración intracelular de 2-OG aumenta, de manera que NtcA activa la transcripción de *nblA*, y reprime parcialmente la de *nsrR1*. El/los otros factores desconocidos que pudieran estar implicados en la represión de *nsrR1* en estas condiciones se representan con un signo de interrogación. Como resultado de dicha represión, no hay suficiente NsrR1 para reprimir la traducción de un exceso de transcrito *nblA*, produciéndose una acumulación de la proteína NblA, que participaría en el proceso de degradación de los ficobilisomas en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado. En el recuadro se representa el esquema del circuito regulador coherente de tipo 4 (Nitzan *et al.*, 2017) que gobernaría este mecanismo de regulación de NblA. Imagen adaptada de (Álvarez-Escribano *et al.*, 2018).

4.2.2. Efecto de NsrR1 sobre la expresión de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120

Mediante el sistema heterólogo *in vivo* implementado en *E. coli* se ha demostrado también una interacción directa entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871* en la zona predicha por el algoritmo IntaRNA (Mann *et al.*, 2017), que deriva en una expresión reducida de la fusión traduccional *all1871::sfGFP* en presencia de NsrR1 con respecto a las células control en las que no se expresa este sRNA (Figura 3.29). Esta interacción, que comprendería los nucleótidos -3 a -40 (con respecto al codón de inicio de la traducción) de la región 5'UTR de *all1871*, y los nucleótidos 39 a 81 de NsrR1, se ha confirmado además en ensayos de protección *in vitro* frente a la degradación por RNasas y acetato de plomo (Figura 3.30). La interacción entre las secuencias que codifican homólogos de NsrR1 y los mRNAs correspondientes a los homólogos de *all1871* está conservada en la mayoría de las cianobacterias que contienen este sRNA (Figura 3.31), lo cual es consistente con el hecho de que este mRNA aparezca como el mejor candidato a ser regulado por NsrR1 en los análisis de CopraRNA, que como ya se ha comentado, tiene en cuenta la conservación filogenética del sRNA y de sus posibles dianas.

En *Nostoc* sp. PCC 7120 la inducción transitoria de *all1871* en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado no depende del regulador NtcA, como se deduce del análisis de Northern blot en la estirpe CSE2 (mutante *ntcA*) (Figura 3.32). Además, la dinámica de expresión del transcrito de *all1871* en una estirpe silvestre en estas condiciones es complementaria a la observada para NsrR1, lo cual es coherente con que este sRNA esté implicado en la regulación de *all1871*.

Dado que la adición de amonio provoca un aumento drástico en los niveles de NsrR1 (Figura 3.16), se seleccionó esta estrategia experimental para analizar los efectos de este sRNA sobre *all1871*. El análisis de Northern blot en la estirpe que carece de NsrR1, $\Delta nsrR1$, donde se observa un aumento en la acumulación del transcrito de *all1871* con respecto a la estirpe silvestre, tanto en la condición de deficiencia de nitrógeno combinado como cuando se añade amonio al medio (Figura 3.35), es consistente con una regulación ejercida por NsrR1 sobre la acumulación de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Estos resultados sugieren que la interacción entre NsrR1 y la región 5'UTR de *all1871* provoca un significativo efecto negativo sobre la acumulación del mRNA de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120, que podría derivar de una traducción reducida de *All1871* en presencia de NsrR1. Sin embargo, la observación de que existe una represión parcial del transcrito de *all1871* en la estirpe $\Delta nsrR1$ tras la adición de amonio al medio (Figura 3.34), sugiere que además de NsrR1 podría haber otros factores implicados en la regulación de este gen. En cualquier caso, dado que la interacción entre NsrR1 y el mRNA de

all1871 tiene lugar cerca del inicio de la traducción, aunque la regulación transcripcional de *all1871* pudiera estar operada por distintos reguladores, la acumulación de la proteína All1871 estaría en última instancia bajo el control de la disponibilidad de nitrógeno combinado a través de NsrR1.

El efecto de NsrR1 sobre la acumulación de la proteína All1871 en *Nostoc* sp. PCC 7120 se ha demostrado mediante análisis de Western blot con anticuerpos frente a All1871 (Figura 3.35). Los cambios detectados en la acumulación de All1871 entre *Nostoc* sp. PCC 7120 y la estirpe $\Delta nsrR1$ son congruentes con una mayor acumulación del transcrito de *all1871* en la estirpe que carece de NsrR1, tanto en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, como cuando se añade amonio al medio (Figura 3.34). Cabe destacar que estas diferencias son mucho más ostensibles a nivel de proteína, lo que es consistente con un efecto de NsrR1 a nivel postranscripcional, siendo la desestabilización del mRNA de *all1871* una consecuencia indirecta de la inhibición de la traducción por NsrR1. Dado que All1871 es una proteína de función desconocida, el papel específico que NsrR1 ejercería en el metabolismo de *Nostoc* sp. PCC 7120 a través de la regulación de All1871 es una incógnita. No obstante, podría sugerirse que las funciones de esta proteína estuvieran relacionadas con la adaptación a cambios en la disponibilidad de nitrógeno, ya que como se ha demostrado, la cantidad de All1871 se reduce cuando se añade amonio a cultivos establecidos en ausencia de nitrógeno combinado, siendo dicha represión dependiente, al menos en parte, de NsrR1 (Figura 3.35).

En *Synechocystis* sp. PCC 6803, el homólogo de *all1871*, *slr0376*, parece formar un operón con los genes *slr0374* y *slr0373* (Singh y Sherman, 2002), los homólogos de los genes *all1872* y *all1873* respectivamente en *Nostoc* sp. PCC 7120, otros dos genes de función desconocida y con una clara respuesta al estrés nutricional por carencia de nitrógeno (Flaherty *et al.*, 2011; Mitschke *et al.*, 2011b). De este modo, parece lógico pensar que los genes *all1873-all1872-all1871* también podrían formar una agrupación génica en *Nostoc* sp. PCC 7120. Esta hipótesis se ve apoyada por los datos transcriptómicos, que sugieren una transcripción conjunta de los genes *all1873* y *all1872* (Mitschke *et al.*, 2011b). Por su parte, el TSS de *all1871* se encuentra 6 nucleótidos aguas abajo del codón de parada de *all1872*, por lo que sus secuencias promotoras se encuentran en la región codificante de este gen. Además, análisis computacionales (Brenes-Álvarez, datos no publicados) han revelado que la agrupación génica formada por *all1873-all1872-all1871* está conservada filogenéticamente en todas las cianobacterias formadoras de heterocistos.

Discusión

En este trabajo también se ha demostrado que la inducción de la expresión de *all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120 en condiciones de carencia de nitrógeno combinado no depende de HetR, como se deduce del análisis de Northern blot en la estirpe 216 (mutante *hetR*) (Figura 3.32), lo que sugiere que la expresión de este transcrito tendría lugar en todas las células del filamento. Esta hipótesis se ha corroborado con un estudio de la localización de la expresión de *all1871* en los filamentos de la estirpe que expresa la fusión traduccional *all1871::gfp* durante el proceso de diferenciación de los heterocistos (Figura 3.36). Cabe destacar que, aunque *all1871* se estaría transcribiendo y traduciendo en todas las células del filamento, su expresión es más abundante en los heterocistos, de manera que la proteína All1871 podría ejercer una función diferencial en heterocistos frente a células vegetativas. Esta observación es congruente con una regulación postranscripcional por parte de NsrR1, cuya transcripción en condiciones de carencia de nitrógeno combinado podría presentar una represión más acusada en los heterocistos, donde los niveles de NtcA son más elevados (Olmedo-Verd *et al.*, 2006; Sandh *et al.*, 2014).

Además, se ha demostrado que la estirpe que carece de la proteína All1871, *all1871::CK3*, no crece en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Figura 3.39), sugiriendo que esta proteína es imprescindible para la adaptación a esta condición nutricional, que requiere el desarrollo de heterocistos funcionales. Se ha observado que la incubación prolongada de los filamentos de la estirpe *all1871::CK3* en medio líquido sin nitrógeno combinado provoca una intensa fragmentación de los mismos. Esta estirpe, a pesar de diferenciar heterocistos aparentemente maduros (Figura 3.40) y presentar transcritos de los genes del operón *nifHDK* (Figura 3.41), no presenta actividad nitrogenasa ni en condiciones óxicas ni en condiciones anóxicas (Tabla 3.6), lo que indica que carece de nitrogenasa funcional. Esto podría deberse, entre otras causas, a que no se expresen otros genes *nif*, o a que los filamentos fragmentados sean incapaces de sostener la actividad nitrogenasa, ya que los heterocistos necesitarían el aporte de energía y el poder reductor por parte de las células vegetativas.

Estudios previos realizados en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 han permitido dilucidar, al menos en parte, algunas de las funciones del operón formado por los genes *slr0373-slr0374-slr0376* (Singh y Sherman, 2002; Jiang *et al.*, 2015), homólogo al operón formado por *all1873-all1872-all1871* en *Nostoc* sp. PCC 7120. Así, la expresión del transcrito *slr0374* se induce en condiciones de deficiencia de hierro o de deficiencia de azufre, y se reprime bajo estrés lumínico (Singh y Sherman, 2002). Además, se ha observado que este gen juega un papel en la adaptación a condiciones limitantes de carbono inorgánico (Jiang *et al.*, 2015).

En esta Tesis Doctoral se ha analizado la expresión de *all1871* en relación a la disponibilidad de carbono (Figura 3.42), y se ha demostrado que la expresión de *all1871* es máxima en condiciones limitantes de carbono inorgánico, reduciéndose al incrementarse la disponibilidad de carbono en el medio. De este modo, se podría sugerir que *all1871* estuviera implicado de alguna forma en la respuesta al estrés nutricional por limitación de carbono. Esta hipótesis es consistente con los análisis de crecimiento realizados en medio líquido (Figuras 3.43 y 3.44), en los que se observó que el crecimiento de la estirpe *all1871::CK3* se detenía a una densidad celular muy baja en comparación con la estirpe silvestre. Sin embargo, cuando se realiza el experimento en presencia de 3% de CO₂ no se aprecian diferencias significativas de crecimiento entre la estirpe silvestre y la estirpe *all1871::CK3*, aunque el crecimiento de la estirpe *all1871::CK3* alcanza la saturación a una densidad de cultivo menor, lo que podría atribuirse a una mayor sensibilidad de la estirpe *all1871::CK3* a la limitación luminosa que se produce en cultivos con una alta densidad celular. Esta observación es congruente con los estudios realizados en *Synechocystis* sp. PCC 6803, donde la transcripción del gen *slr0374* se reprime en condiciones de baja intensidad lumínica (Singh y Sherman, 2002), lo que indicaría que el producto de dicho gen sería necesario en situaciones de deficiencia de luz.

De este modo, la proteína All1871, sometida a una regulación postranscripcional por NsrR1, parece ser esencial tanto en el proceso de adaptación a la deficiencia de nitrógeno combinado, como en la adaptación al estrés nutricional por limitación de carbono. Como se ha comentado en la Introducción, los metabolismos del carbono y del nitrógeno están estrechamente relacionados entre sí, y su regulación es fundamental para que las bacterias se adapten a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes (Jiang *et al.*, 2018).

4.3. Conclusión

La respuesta de las cianobacterias a la deficiencia en nitrógeno combinado implica la inducción o represión de la transcripción de numerosos genes, en su mayoría de forma dependiente del regulador global de la asimilación de nitrógeno en estos organismos, NtcA. La expresión de los dos sRNAs estudiados en esta Tesis Doctoral, NsiR3 y NsrR1, está regulada directamente por NtcA (Figuras 3.5 y 3.18). A su vez, NsiR3 y NsrR1 ejercen una regulación postranscripcional sobre la acumulación de otros transcritos (sus correspondientes mRNAs diana), constituyendo así un nivel indirecto de control por NtcA (Figura 4.5).

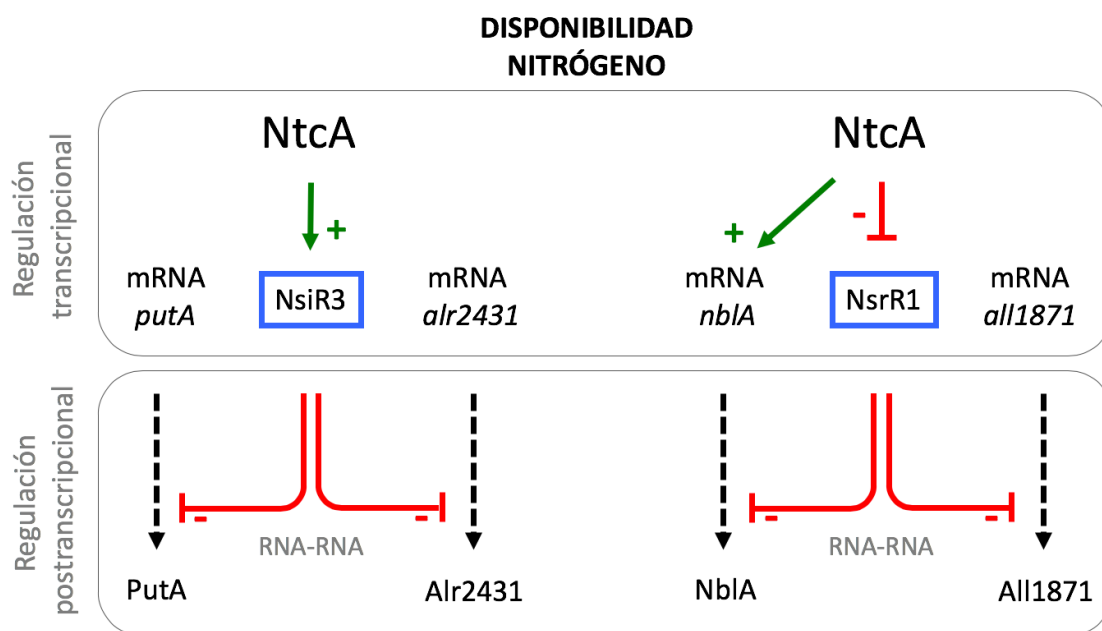


Figura 4.5. Modelo propuesto para la regulación transcripcional que NtcA opera sobre NsiR3 y NsrR1, y la regulación postranscripcional que estos sRNAs ejercen sobre sus mRNAs diana según la disponibilidad de nitrógeno combinado. Se señalan los eventos de regulación transcripcional (marco superior) y postranscripcional (marco inferior).

En todos los casos analizados en este trabajo, la interacción entre los sRNAs de estudio y sus mRNAs diana tiene lugar cerca del inicio de la traducción de estos mensajeros, lo que podría derivar en la inhibición de la traducción de los mismos. De este modo, el significativo efecto negativo que ejercen NsiR3 y NsrR1 sobre la acumulación de sus mRNAs diana en *Nostoc* sp. PCC 7120 podría atribuirse a la desestabilización indirecta del mensajero cuando se inhibe la traducción, o a un efecto más directo del sRNA sobre la estabilidad del mRNA vía la degradación de éste a través del reclutamiento de RNasas (Figura 1.9). Los mecanismos detallados de la regulación postranscripcional ejercida por los sRNAs analizados en este trabajo deberán ser objeto de estudios adicionales en el futuro.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- I. La transcripción de NsiR3 se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y depende de NtcA, que se une a la secuencia conservada GTKN₈YAC, centrada en la posición -42,5 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *nsiR3*.
- II. NsiR3 interacciona con la región 5'UTR del mRNA de *alr2431*. Esta interacción tiene como resultado una reducción de la acumulación de este mensajero cuando se sobreexpresa NsiR3.
- III. NsiR3 interacciona con la región 5'UTR del mRNA de *putA* en una posición muy próxima al codón de inicio de la traducción. Esta interacción tiene como resultado una reducción de la acumulación de este mensajero cuando se sobreexpresa NsiR3.
- IV. La transcripción de NsrR1 se reprime en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y depende parcialmente de NtcA, que se une a la secuencia conservada GTRN₈TAC, centrada en la posición -16,5 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *nsrR1*.
- V. NsrR1 interacciona con la región 5'UTR mRNA de *nblA* en una posición muy próxima al codón de inicio de la traducción. Esta interacción tiene como resultado una reducción de la acumulación de este mensajero.
- VI. NsrR1 interacciona con la región 5'UTR del mRNA de *all1871* en una posición muy próxima al codón de inicio de la traducción. Esta interacción tiene como resultado una reducción de la acumulación de este mensajero, así como una reducción de la acumulación de la proteína All1871 cuando se sobreexpresa NsrR1.
- VII. El gen *all1871* se induce en condiciones de carencia de nitrógeno combinado, presenta una expresión más abundante en los heterocistos que en las células vegetativas y es necesario para el crecimiento diazotrófico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.G. (2000). Symbiotic Interactions. En Whitton B. A. y Potts M. (eds), *The ecology of cyanobacteria, their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 523-561.
- Adler, S.P., Purich, D., y Stadtman, E.R. (1975). Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the P_{II} regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 6264-6272.
- Alda, J.A.G.O.d., Esteban, R., Diago, M.L., y Houmard, J. (2014). The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nature Communications* 5, 4937. doi: 10.1038/ncomms5937.
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics* 8, 450-461. doi: 10.1038/nrg2102.
- Altuvia, S. (2007). Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Current Opinion in Microbiology* 10, 257-261. doi: 10.1016/j.mib.2007.05.003.
- Álvarez-Escribano, I., Vioque, A., y Muro-Pastor, A.M. (2018). NsrR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of *nblA* in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Frontiers in Microbiology* 9, 2267. doi: 10.3389/fmicb.2018.02267.
- Amann, E., Ochs, B., y Abel, K.J. (1988). Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69, 301-315.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H., et al. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current Biology* 11, 941-950. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00270-6.
- Attaiech, L., Glover, J.N.M., y Charpentier, X. (2017). RNA chaperones step out of Hfq's shadow. *Trends in Microbiology* 25, 247-249. doi: 10.1016/j.tim.2017.01.006.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., et al. (2006). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, N.Y.
- Axmann, I.M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H., y Hess, W.R. (2005). Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biology* 6, R73. doi: 10.1186/gb-2005-6-9-r73.
- Baier, A., Winkler, W., Korte, T., Lockau, W., y Karradt, A. (2014). Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: evidence for essential formation of an NblA1/NblA2 heterodimer and its codegradation by a Clp protease complex. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 11755-11766. doi: 10.1074/jbc.M113.520601.
- Baier, K., Lehmann, H., Stephan, D.P., y Lockau, W. (2004). NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. *Microbiology* 150, 2739-2749. doi: 10.1099/mic.0.27153-0.
- Bailey, S., y Grossman, A. (2008). Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochemistry and Photobiology* 84, 1410-1420. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00453.x.
- Beale, S.I. (1994). Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls, and phycobilins. En Bryant D. A. (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp 519-558.

Bibliografía

- Beisel, C.L., y Storz, G. (2011). The base-pairing RNA Spot 42 participates in a multioutput feed forward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 41, 286-297. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.027.
- Bienert, R., Baier, K., Volkmer, R., Lockau, W., y Heinemann, U. (2006). Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 5216-5223. doi: 10.1074/jbc.M507243200.
- Billis, K., Billini, M., Tripp, H.J., Kyrpides, N.C., y Mavromatis, K. (2014). Comparative transcriptomics between *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 provide insights into mechanisms of stress acclimation. *Plos One* 9, e109738. doi: 10.1371/journal.pone.0109738.
- Black, T.A., Cai, Y., y Wolk, C.P. (1993). Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Molecular Microbiology* 9, 77-84. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01670.x.
- Bobrovskyy, M., y Vanderpool, C.K. (2013). Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annual Review of Genetics* 47, 209-232. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133445.
- Bøggild, A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P., y Brodersen, D.E. (2009). Cyanobacteria contain a structural homologue of the Hfq protein with altered RNA-binding properties. *The FEBS Journal* 276, 3904-3915. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07104.x.
- Boyer, H.W., y Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41, 459-472. doi: 10.1016/0022-2836(69)90288-5.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brantl, S. (2007). Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Current Opinion In Microbiology* 10, 102-109. doi: 10.1016/j.mib.2007.03.012.
- Breaker, R.R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 4. doi: 10.1101/cshperspect.a003566.
- Brenes-Álvarez, M., Olmedo-Verd, E., Vioque, A., y Muro-Pastor, A.M. (2016). Identification of conserved and potentially regulatory small RNAs in heterocystous cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 7:48. doi: 10.3389/fmicb.2016.00048.
- Browning, D.F., y Busby, S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews. Microbiology* 2, 57-65. doi: 10.1038/nrmicro787.
- Bryce, T.A., Welti, D., Walsby, A.E., y Nichols, B.W. (1972). Monohecoside derivatives of long-chain polyhydroxy alcohols; a novel class of glycolipid specific to heterocystous algae. *Phytochemistry* 11, 295-302. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90006-2.
- Buick, R. (1992). The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science* 255, 74-77. doi: 10.1126/science.11536492.
- Buikema, W.J., y Haselkorn, R. (1991). Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes & Development* 5, 321-330.

- Buikema, W.J., y Haselkorn, R. (2001). Expression of the *Anabaena* *hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2729-2734. doi: 10.1073/pnas.051624898.
- Burnap, L.R., Hagemann, M., y Kaplan, A. (2015). Regulation of CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. *Life* 5, 348-371. doi: 10.3390/life5010348.
- Burnat, M., y Flores, E. (2014). Inactivation of agmatinase expressed in vegetative cells alters arginine catabolism and prevents diazotrophic growth in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. *Microbiology Open* 3, 777-792. doi: 10.1002/mbo3.207.
- Burnat, M., Picossi, S., Valladares, A., y Herrero, A. (2019). Catabolic pathway of arginine in *Anabaena* involves a novel bifunctional enzyme that produces proline from arginine. *Molecular Microbiology*, en prensa. doi: 10.1111/mmi.14203.
- Cai, Y.P., y Wolk, C.P. (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *The Journal of Bacteriology* 172, 3138-3145. doi: 10.1128/JB.186.11.3346-3354.2004.
- Cardemil, L., y Wolk, C.P. (1979). The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 736-741.
- Cardona, T., y Magnuson, A. (2010). Excitation energy transfer to photosystem I in filaments and heterocysts of *Nostoc punctiforme*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 425-433. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.12.014.
- Carrier, M.C., Lalaouna, D., y Masse, E. (2016). A game of tag: MAPS catches up on RNA interactomes. *RNA Biology* 13, 473-476. doi: 10.1080/15476286.2016.1156830.
- Collier, J.L., y Grossman, A.R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology* 174, 4718-4726.
- Collier, J.L., y Grossman, A.R. (1994). A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *The EMBO Journal* 13, 1039-1047. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06352.x.
- Corcoran, C.P., Podkaminski, D., Papenfort, K., Urban, J.H., Hinton, J.C.D., y Vogel, J. (2012). Superfolder GFP reporters validate diverse new mRNA targets of the classic porin regulator, MicF RNA. *Molecular Microbiology* 84, 428-445. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08031.x.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., y Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38. doi: 10.1016/0378-1119(95)00685-0.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563.
- Chao, Y., Papenfort, K., Reinhardt, R., Sharma, C.M., y Vogel, J. (2012). An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *The EMBO Journal* 31, 4005-4019. doi: 10.1038/emboj.2012.229.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., López, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., et al. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31, 3497-3500. doi: 10.1093/nar/gkg500.

Bibliografía

- De Lay, N., y Gottesman, S. (2009). The Crp-activated small non-coding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *Journal of Bacteriology* 191, 461-467. doi: 10.1128/JB.01157-08.
- de Porcellinis, A.J., Klähn, S., Rosgaard, L., Kirsch, R., Gutekunst, K., Georg, J., et al. (2016). The non-coding RNA Ncr0700/PmgR1 is required for photomixotrophic growth and the regulation of glycogen accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiology* 57, 2091-2103. doi: 10.1093/pcp/pcw128.
- DeRuyter, Y.S., y Fromme, P. (2008). Molecular structure of the photosynthetic apparatus. En Herrero, A. y Flores, E. (eds), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp 217-269.
- Dienst, D., Dühning, U., Mollenkopf, H.J., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W.R., et al. (2008). The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 154, 3134-3143. doi: 10.1099/mic.0.2008/020222-0.
- Donze, M., Haveman, J., y Schiereck, P. (1972). Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochimica et Biophysica Acta* 256, 157-161.
- Dühning, U., Axmann, I.M., Hess, W.R., y Wilde, A. (2006). An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7054. doi: 10.1073/pnas.0600927103.
- Durand, S., y Storz, G. (2010). Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small RNA. *Molecular Microbiology* 75, 1215-1231. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07044.x.
- Eisenhut, M., Georg, J., Klähn, S., Sakurai, I., Mustila, H., Zhang, P., et al. (2012). The antisense RNA As1_flv4 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 prevents premature expression of the *flv4-2* operon upon shift in inorganic carbon supply. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 33153-33162. doi: 10.1074/jbc.M112.391755.
- Elhai, J., Vepritskiy, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Wolk, C.P. (1997). Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 179, 1998-2005.
- Elhai, J., y Wolk, C.P. (1988a). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167, 747-754. doi: 10.1016/0076-6879(88)67086-8.
- Elhai, J., y Wolk, C.P. (1988b). A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68, 119-138. doi: 10.1016/0378-1119(88)90605-1.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S., y Contreras, A. (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with P_{II} and NtcA. *Molecular Microbiology* 61, 457-469. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05231.x.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Milligan, A.J., Fennel, K., Cramer, B.S., Aubry, M.P., et al. (2005). The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* 309, 2202-2204. doi: 10.1126/science.1116047.
- Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* 56, 340-373.

- Flaherty, B.L., Van Nieuwerburgh, F., Head, S.R., y Golden, J.W. (2011). Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. *BMC Genomics* 12, 332. doi: 10.1186/1471-2164-12-332.
- Fleming, H., y Haselkorn, R. (1974). The program of protein synthesis during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell* 3, 169-170.
- Flores, E., y Herrero, A. (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En Bryant D. A. (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 487-517.
- Flores, E., y Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8, 39-50. doi: 10.1038/nrmicro2242.
- Flores, E., Picossi, S., Valladares, A., y Herrero, A. (2018). Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, en prensa. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.04.006.
- Forcada-Nadal, A., Forchhammer, K., y Rubio, V. (2014). SPR analysis of promoter binding of *Synechocystis* PCC6803 transcription factors NtcA and CRP suggests cross-talk and sheds light on regulation by effector molecules. *FEBS Letters* 588, 2270-2276. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.010.
- Forcada-Nadal, A., Llácer, J.L., Contreras, A., Marco-Marín, C., y Rubio, V. (2018). The P_{II}-NAGK-PipX-NtcA regulatory axis of cyanobacteria: a tale of changing partners, allosteric effectors and non-covalent interactions. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5, 91. doi: 10.3389/fmolb.2018.00091.
- Forchhammer, K. (2004). Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 319-333. doi: 10.1016/j.femsre.2003.11.001.
- Frías, J.E., Flores, E., y Herrero, A. (1994). Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Molecular Microbiology* 14, 823-832. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01318.x.
- Fröhlich, K.S., y Vogel, J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Current Opinion in Microbiology* 12, 674-682. doi: 10.1016/j.mib.2009.09.009.
- Galmozzi, C.V., Saelices, L., Florencio, F.J., y Muro-Pastor, M.I. (2010). Posttranscriptional regulation of glutamine synthetase in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120: differential expression between vegetative cells and heterocysts. *Journal of Bacteriology* 192, 4701-4711. doi: 10.1128/JB.00222-10.
- García-Domínguez, M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (1999). Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7161-7166.
- Garst, A.D., Edwards, A.L., y Batey, R.T. (2011). Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003533. doi: 10.1101/cshperspect.a003533.
- Georg, J., Dienst, D., Schurgers, N., Wallner, T., Kopp, D., Stazic, D., et al. (2014). The small regulatory RNA SyR1/PsrR1 controls photosynthetic functions in cyanobacteria. *The Plant Cell* 26, 3661-3679. doi: 10.1105/tpc.114.129767.

Bibliografía

- Georg, J., y Hess, W.R. (2011). *cis*-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75, 286-300. doi: 10.1128/mmbr.00032-10.
- Georg, J., y Hess, W.R. (2018). Widespread antisense transcription in prokaryotes. *Microbiology Spectrum* 6, 4. doi: 10.1128/microbiolspec.RWR-0029-2018.
- Georg, J., Voß, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A., y Hess, W.R. (2009). Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Molecular Systems Biology* 5, 305-305. doi: 10.1038/msb.2009.63.
- Gierga, G., Voß, B., y Hess, W.R. (2012). Non-coding RNAs in marine *Synechococcus* and their regulation under environmentally relevant stress conditions. *The ISME Journal* 6, 1544-1557. doi: 10.1038/ismej.2011.215.
- Giner-Lamia, J., Robles-Rengel, R., Hernández-Prieto, M.A., Muro-Pastor, M.I., Florencio, F.J., y Futschik, M.E. (2017). Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Nucleic Acids Research* 45, 11800-11820. doi: 10.1093/nar/gkx860.
- Giordano, M., Beardall, J., y Raven, J.A. (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56, 99-131. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J., y Pace, N.R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* 170, 3584-3592.
- Glazer, A.N. (1987). Phycobilisomes: assembly and attachment. En Fay P. y Van Baalen (eds), *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers B. V., New York. pp 69-94.
- González, A., Bes, M.T., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2016). Expanding the role of FurA as essential global regulator in cyanobacteria. *Plos One* 11, e0151384. doi: 10.1371/journal.pone.0151384.
- Gottesman, S., y Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003798. doi: 10.1101/cshperspect.a003798.
- Griese, M., Lange, C., y Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 323, 124-131. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., y Collier, J.L. (1993a). Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 175, 575-582. doi: 10.1128/jb.175.3.575-582.1993.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., y Collier, J.L. (1993b). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews* 57, 725-749.
- Guillier, M., y Gottesman, S. (2008). The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Research* 36, 6781-6794. doi: 10.1093/nar/gkn742.

- Guo, M.S., Updegrove, T.B., Gogol, E.B., Shabalina, S.A., Gross, C.A., y Storz, G. (2014). MicL, a new σ^E -dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes Development* 28, 1620-1634. doi: 10.1101/gad.243485.114.
- Gutu, A., y Kehoe, D.M. (2012). Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. *Molecular Plant* 5, 1-13. doi: 10.1093/mp/ssr054.
- Han, K., Tjaden, B., y Lory, S. (2016). GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of bacterial small regulatory RNA by *in vivo* proximity ligation. *Nature Microbiology* 2, 16239. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.239.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hao, Y., Updegrove, T.B., Livingston, N.N., y Storz, G. (2016). Protection against deleterious nitrogen compounds: role of σ^S -dependent small RNAs encoded adjacent to *sdiA*. *Nucleic Acids Research* 44, 6935-6948. doi: 10.1093/nar/gkw404.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R., y Stanier, R.Y. (1979). Genome size of cyanobacteria. *Microbiology* 111, 73-85. doi: 10.1099/00221287-111-1-73.
- Hernández, J.A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., Bes, M.T., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2006). Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Molecular Biology* 355, 325-334. doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.079.
- Herrero, A., y Flores, E. (2019). Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena*. *Environmental Microbiology* 21, 1-17. doi: 10.1111/1462-2920.14370.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., y Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 183, 411-425. doi: 10.1128/JB.183.2.411-425.2001.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., y Flores, E. (2004). Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 469-487. doi: 10.1016/j.femsre.2004.04.003.
- Herrero, A., Stavans, J., y Flores, E. (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiology Review* 40, 831-854. doi: 10.1093/femsre/fuw029.
- Hess, W.R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology* 14, 608-614. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.024.
- Hohmann-Marriott, M.F., y Blankenship, R.E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 62, 515-548. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103811.
- Hoiczky, E., y Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* 182, 1191. doi: 10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000.
- Holmqvist, E., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., y Vogel, J. (2018). Global maps of ProQ binding *in vivo* reveal target recognition via RNA structure and stability control at mRNA 3' ends. *Molecular Cell* 70, 971-982. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.017.
- Holmqvist, E., y Vogel, J. (2018). RNA-binding proteins in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 16, 601-615. doi: 10.1038/s41579-018-0049-5.

Bibliografía

- Huang, T.C., Lin, R.F., Chu, M.K., y Chen, H.M. (1999). Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology* 145, 743-753. doi: 10.1099/13500872-145-3-743.
- Ionescu, D., Voß, B., Oren, A., Hess, W.R., y Muro-Pastor, A.M. (2010). Heterocyst-specific transcription of NsiR1, a non-coding RNA encoded in a tandem array of direct repeats in cyanobacteria. *Journal of Molecular Biology* 398, 177-188. doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.010.
- Jager, K.M., y Bergman, B. (1991). Localization of a multifunctional chaperonin (GroEL protein) in nitrogen-fixing *Anabaena* PCC 7120 : presence in vegetative cells and heterocysts. *Planta* 183, 120-125. doi: 10.1007/bf00197575.
- Jagodnik, J., Brosse, A., Le Lam, T.N., Chiaruttini, C., y Guillier, M. (2017). Mechanistic study of base-pairing small regulatory RNAs in bacteria. *Methods* 117, 67-76. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.09.012.
- Jiang, H.B., Song, W.Y., Cheng, H.M., y Qiu, B.S. (2015). The hypothetical protein Ycf46 is involved in regulation of CO₂ utilization in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta* 241, 145-155. doi: 10.1007/s00425-014-2169-0.
- Jiang, Y.L., Wang, X.P., Sun, H., Han, S.J., Li, W.F., Cui, N., et al. (2018). Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 403-408. doi: 10.1073/pnas.1716062115.
- Kadowaki, T., Nagayama, R., Georg, J., Nishiyama, Y., Wilde, A., Hess, W.R., et al. (2016). A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiology* 57, 813-823. doi: 10.1093/pcp/pcw028.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., et al. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research* 8, 205-213.
- Kaplan, A., y Reinhold, L. (1999). CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 539-570. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.539.
- Karradt, A., Sobanski, J., Mattow, J., Lockau, W., y Baier, K. (2008). NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 32394-32403. doi: 10.1074/jbc.M805823200.
- Kerfeld, C.A., y Melnicki, M.R. (2016). Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Current Opinion in Plant Biology* 31, 66-75. doi: 10.1016/j.pbi.2016.03.009.
- Klähn, S., Bolay, P., Wright, P.R., Atilho, R.M., Brewer, K.I., Hagemann, M., et al. (2018). A glutamine riboswitch is a key element for the regulation of glutamine synthetase in cyanobacteria. *Nucleic Acids Research* 46, 10082-10094. doi: 10.1093/nar/gky709.

- Klähn, S., Schaal, C., Georg, J., Baumgartner, D., Knippen, G., Hagemann, M., et al. (2015). The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E6243-E6252. doi: 10.1073/pnas.1508412112.
- Knoll, A.H. (2008). Cyanobacteria and Earth history. En Herrero, A. y Flores, E. (eds), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp 1-19.
- Kopf, M., y Hess, W.R. (2015). Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 301-315. doi: 10.1093/femsre/fuv017.
- Kopf, M., Klähn, S., Pade, N., Weingartner, C., Hagemann, M., Voß, B., et al. (2014a). Comparative genome analysis of the closely related *Synechocystis* strains PCC 6714 and PCC 6803. *DNA Research* 21, 255-266. doi: 10.1093/dnares/dst055.
- Kopf, M., Klähn, S., Scholz, I., Matthiessen, J.K., Hess, W.R., y Voß, B. (2014b). Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research* 21, 527-539. doi: 10.1093/dnares/dsu018.
- Kopf, M., Klähn, S., Voß, B., Stüber, K., Huettel, B., Reinhardt, R., et al. (2014c). Finished genome sequence of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *Genome Announcements* 2, e00757-00714. doi: 10.1128/genomeA.00757-14.
- Kopf, M., Möke, F., Bauwe, H., Hess, W.R., y Hagemann, M. (2015). Expression profiling of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia* CCY9414 under light and oxidative stress conditions. *The ISME Journal* 9, 2139-2152. doi: 10.1038/ismej.2015.16.
- Kroth, P.G. (2015). The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of Plant Physiology* 172, 76-81. doi: 10.1016/j.jplph.2014.07.021.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang, N., J., y Fay, P. (1971). The heterocysts of blue-green algae II. Details of ultrastructure. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences* 178, 193-203. doi: 10.1098/rspb.1971.0061.
- Lang, N., Simon, R.D., y Wolk, C.P. (1972). Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*. *Archives of Microbiology* 83, 313-320. doi: 10.1007/BF00425243.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I.R., Vergara-Irigaray, M., et al. (2011). Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20172-20177. doi: 10.1073/pnas.1113521108.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., y Gingeras, T.R. (2012). An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA Biology* 9, 1039-1044. doi: 10.4161/rna.21167.
- Leonhardt, K., y Straus, N.A. (1994). Photosystem II genes *isiA*, *psbDI* and *psbC* in *Anabaena* sp. PCC 7120: cloning, sequencing and the transcriptional regulation in iron-stressed and iron-repleted cells. *Plant Molecular Biology* 24, 63-73.
- Levi, M., Sendersky, E., y Schwarz, R. (2018). Decomposition of cyanobacterial light harvesting complexes: NblA-dependent role of the bilin lyase homolog NblB. *The Plant Journal* 94, 813-821. doi: 10.1111/tpj.13896.

Bibliografía

- Levine, E., y Hwa, T. (2008). Small RNAs establish gene expression thresholds. *Current Opinion in Microbiology* 11, 574-579. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.016>.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L., et al. (2013). Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* 342, 1104-1107. doi: [10.1126/science.1242321](https://doi.org/10.1126/science.1242321).
- Liu, L.K., Becker, D.F., y Tanner, J.J. (2017). Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 632, 142-157. doi: [10.1016/j.abb.2017.07.005](https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.005).
- Livny, J., y Waldor, M.K. (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Current Opinion in Microbiology* 10, 96-101. doi: [10.1016/j.mib.2007.03.005](https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.005).
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., et al. (2009). A *trans*-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139, 770-779. doi: [10.1016/j.cell.2009.08.046](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.046).
- López-Igual, R., Picossi, S., López-Garrido, J., Flores, E., y Herrero, A. (2012). N and C control of ABC-type bicarbonate transporter Cmp and its LysR-type transcriptional regulator CmpR in a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Environmental Microbiology* 14, 1035-1048. doi: [10.1111/j.1462-2920.2011.02683.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02683.x).
- Luque, I., Flores, E., y Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO Journal* 13, 2862-2869.
- Luque, I., y Forchhammer, K. (2008). Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. En Herrero, A. y Flores, E. (eds), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp 335-382.
- Luque, I., Ochoa De Alda, J.A., Richaud, C., Zabulon, G., Thomas, J.C., y Houmard, J. (2003). The NblA protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components. *Molecular Microbiology* 50, 1043-1054. doi: [10.1046/j.1365-2958.2003.03768.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03768.x).
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A., y Houmard, J. (2001). Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Molecular Microbiology* 41, 937-947. doi: [10.1046/j.1365-2958.2001.02566.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02566.x).
- Lutz, R., y Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research* 25, 1203-1210.
- Lybecker, M., Zimmermann, B., Bilusic, I., Tukhtubaeva, N., y Schroeder, R. (2014). The double-stranded transcriptome of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 3134-3139. doi: [10.1073/pnas.1315974111](https://doi.org/10.1073/pnas.1315974111).
- Lyons, T.W., Reinhard, C.T., y Planavsky, N.J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* 506, 307-315. doi: [10.1038/nature13068](https://doi.org/10.1038/nature13068).
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry* 140, 315-322.
- Magnuson, A. (2019). Heterocyst thylakoid bioenergetics. *Life* 9, 13. doi: [10.3390/life9010013](https://doi.org/10.3390/life9010013).

- Magnuson, A., y Cardona, T. (2016). Thylakoid membrane function in heterocysts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857, 309-319. doi: 10.1016/j.bbabo.2015.10.016.
- Maldener, I., Lockau, W., Cai, Y.P., y Wolk, C.P. (1991). Calcium-dependent protease of the cyanobacterium *Anabaena*: molecular cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*, sequencing and site-directed mutagenesis. *Molecular and General Genetics* 225, 113-120.
- Mandin, P., y Guillier, M. (2013). Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *Current Opinion in Microbiology* 16, 125-132. doi: 10.1016/j.mib.2012.12.005.
- Mangan, S., Zaslaver, A., y Alon, U. (2003). The coherent feedforward loop serves as a sign-sensitive delay element in transcription networks. *Journal of Molecular Biology* 334, 197-204. doi: doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.049.
- Mann, M., Wright, P.R., y Backofen, R. (2017). IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Research* 45, W435-W439. doi: 10.1093/nar/gkx279.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 29, 21-38.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87, 206-210. doi: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
- Martín-Figueroa, E., Navarro, F., y Florencio, F.J. (2000). The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters* 476, 282-286. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01722-1.
- Mazel, D., Houmard, J., Castets, A.M., y Tandeau de Marsac, N. (1990). Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *Journal of Bacteriology* 172, 2755-2761.
- McKinney, R.E. (1953). Staining bacterial polysaccharides. *The Journal of Bacteriology* 66, 453-454.
- Meeks, J.C., y Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 94-121. doi: 10.1128/MMBR.66.1.94-121.2002.
- Meeks, J.C., Wolk, C.P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P.W., y Chien, W.S. (1978). Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *Journal of Bacteriology* 134, 125-130.
- Mehta, P., Goyal, S., y Wingreen, N.S. (2008). A quantitative comparison of sRNA-based and protein-based gene regulation. *Molecular Systems Biology* 4, 221. doi: 10.1038/msb.2008.58.
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Mullineaux, C.W., Herrero, A., y Flores, E. (2010). Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Molecular Microbiology* 75, 1159-1170. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07031.x.

Bibliografía

- Misra, H.S., y Tuli, R. (2000). Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiology* 122, 731-736. doi: doi.org/10.1104/pp.122.3.731.
- Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C.M., Dienst, D., Bantscheff, J., et al. (2011a). An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 2124-2129. doi: 10.1073/pnas.1015154108.
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W.R., y Muro-Pastor, A.M. (2011b). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20130-20135. doi: 10.1073/pnas.1112724108.
- Miyakoshi, M., Chao, Y., y Vogel, J. (2015). Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Current Opinion Microbiology* 24, 132-139. doi: 10.1016/j.mib.2015.01.013.
- Mohamed, A., y Jansson, C. (1989). Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Molecular Biology* 13, 693-700.
- Møller, T., Franch, T., Udesen, C., Gerdes, K., y Valentin-Hansen, P. (2002). Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes & Development* 16, 1696-1706. doi: 10.1101/gad.231702.
- Montgomery, B.L. (2016). Mechanisms and fitness implications of photomorphogenesis during chromatic acclimation in cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany* 67, 4079-4090. doi: 10.1093/jxb/erw206.
- Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A., y Capone, D.G. (2004). High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430, 1027-1032. doi: 10.1038/nature02824.
- Moreno, R., Fonseca, P., y Rojo, F. (2012). Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Molecular Microbiology* 83, 24-40. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07912.x.
- Muñoz-Marín, M.C., Luque, I., Zubkov, M.V., Hill, P.G., Díez, J., y García-Fernández, J.M. (2013). *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 8597-85602. doi: 10.1073/pnas.1221775110.
- Muro-Pastor, A.M. (2014). The heterocyst-specific NsiR1 small RNA is an early marker of cell differentiation in cyanobacterial filaments. *mBio* 5, e01079-01014. doi: 10.1128/mBio.01079-14.
- Muro-Pastor, A.M., Brenes-Álvarez, M., y Vioque, A. (2017). A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacterium. *Environmental Microbiology Reports* 9, 449-458. doi: 10.1111/1758-2229.12555.
- Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Herrero, A. (2009). NtcA-regulated heterocyst differentiation genes *hetC* and *devB* from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 exhibit a similar tandem promoter arrangement. *Journal of Bacteriology* 191, 5765-5774. doi: 10.1128/JB.00616-09.
- Muro-Pastor, A.M., y Hess, W.R. (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends in Microbiology* 20, 548-557. doi: 10.1016/j.tim.2012.07.005.

- Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., Flores, E., y Herrero, A. (2002). Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Molecular Microbiology* 44, 1377-1385. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02970.x.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 38320-38328. doi: 10.1074/jbc.M105297200.
- Murray, N.E., Brammar, W.J., y Murray, K. (1977). Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Molecular & General Genetics* 150, 53-61.
- Murry, M., y Wolk, C. (1989). Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Archives of Microbiology* 151, 469-474. doi: 10.1007/BF00454860.
- Nitzan, M., Rehani, R., y Margalit, H. (2017). Integration of bacterial small RNAs in regulatory networks. *Annual Review of Biophysics* 46, 131-148. doi: 10.1146/annurev-biophys-070816-034058.
- Olejniczak, M., y Storz, G. (2017). ProQ/FinO-domain proteins: another ubiquitous family of RNA matchmakers? *Molecular Microbiology* 104, 905-915. doi: 10.1111/mmi.13679.
- Olmedo-Verd, E., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Herrero, A. (2006). Localized induction of the *ntcA* regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 188, 6694-6699. doi: 10.1128/JB.00509-06.
- Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., y Maeda, S. (2001). Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 183, 1891-1898. doi: 10.1128/jb.183.6.1891-1898.2001.
- Opdyke, J.A., Kang, J.G., y Storz, G. (2004). GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186, 6698-6705. doi: 10.1128/jb.186.20.6698-6705.2004.
- Pandey, S.P., Minesinger, B.K., Kumar, J., y Walker, G.C. (2011). A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Research* 39, 4691-4708. doi: 10.1093/nar/gkr060.
- Papenfort, K., Bouvier, M., Mika, F., Sharma, C.M., y Vogel, J. (2010). Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20435-20440. doi: 10.1073/pnas.1009784107.
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Lucchini, S., Sonawane, A., Hinton, J.C.D., y Vogel, J. (2008). Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Molecular Microbiology* 68, 890-906. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06189.x.
- Papenfort, K., Podkaminski, D., Hinton, J.C., y Vogel, J. (2012). The ancestral SgrS RNA discriminates horizontally acquired *Salmonella* mRNAs through a single G-U wobble pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E757-764. doi: 10.1073/pnas.1119414109.

Bibliografía

- Papenfort, K., y Vogel, J. (2014). Small RNA functions in carbon metabolism and virulence of enteric pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 91. doi: 10.3389/fcimb.2014.00091.
- Peer, A., y Margalit, H. (2011). Accessibility and evolutionary conservation mark bacterial small-RNA target-binding regions. *Journal of Bacteriology* 193, 1690-1701. doi: 10.1128/jb.01419-10.
- Pfreundt, U., Kopf, M., Belkin, N., Berman-Frank, I., y Hess, W.R. (2014). The primary transcriptome of the marine diazotroph *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Scientific Reports* 4, 6187. doi: 10.1038/srep06187.
- Picossi, S., Flores, E., y Herrero, A. (2014). ChIP analysis unravels an exceptionally wide distribution of DNA binding sites for the NtcA transcription factor in a heterocyst-forming cyanobacterium. *BMC Genomics* 15, 22. doi: 10.1186/1471-2164-15-22.
- Picossi, S., Flores, E., y Herrero, A. (2015). The LysR-type transcription factor PacR is a global regulator of photosynthetic carbon assimilation in *Anabaena*. *Environmental Microbiology* 17, 3341-3351. doi: 10.1111/1462-2920.12800.
- Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., y Long, B.M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany* 59, 1441-1461. doi: 10.1093/jxb/erm112.
- Puerta-Fernández, E., y Vioque, A. (2011). Hfq is required for optimal nitrate assimilation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 193, 3546-3555. doi: 10.1128/jb.00254-11.
- Ramasubramanian, T.S., Wei, T.F., y Golden, J.W. (1994). Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *Journal of Bacteriology* 176, 1214-1223.
- Reade, J.P., Dougherty, L.J., Rogers, L.J., y Gallon, J.R. (1999). Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiology* 145, 1749-1758. doi: 10.1099/13500872-145-7-1749.
- Richter, A.S., y Backofen, R. (2012). Accessibility and conservation: general features of bacterial small RNA-mRNA interactions? *RNA Biology* 9, 954-965. doi: 10.4161/rna.20294.
- Rippka, R. (1972). Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Archives of Microbiology* 87, 93-98. doi: 10.1007/BF00424781.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., y Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111, 1-61. doi: doi:10.1099/00221287-111-1-1.
- Rivas, E., Klein, R.J., Jones, T.A., y Eddy, S.R. (2001). Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Current Biology* 11, 1369-1373. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00401-8.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., et al. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 1042-1047. doi: 10.1038/nature01947.

- Sakurai, I., Stazic, D., Eisenhut, M., Vuorio, E., Steglich, C., Hess, W.R., et al. (2012). Positive regulation of *psbA* gene expression by *cis*-encoded antisense RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 160, 1000-1010. doi: 10.1104/pp.112.202127.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Baracaldo, P., Hayes, P.K., y Blank, C.E. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3, 145-165. doi: 10.1111/j.1472-4669.2005.00050.x.
- Sandh, G., Ramstrom, M., y Stensjö, K. (2014). Analysis of the early heterocyst Cys-proteome in the multicellular cyanobacterium *Nostoc punctiforme* reveals novel insights into the division of labor within diazotrophic filaments. *BMC Genomics* 15, 1064.
- Schirrmeister, B.E., Gugger, M., y Donoghue, P.C. (2015). Cyanobacteria and the great oxidation event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* 58, 769-785. doi: 10.1111/pala.12178.
- Schmetterer, G. (1994). Cyanobacterial respiration. En Bryant, D. A. (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 409-435.
- Schopf, J.W., y Packer, B.M. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70-73.
- Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., y Dean, D.R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry* 78, 701-722. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812.
- Sendersky, E., Kozar, N., Levi, M., Garini, Y., Shav-Tal, Y., y Schwarz, R. (2014). The proteolysis adaptor, NblA, initiates protein pigment degradation by interacting with the cyanobacterial light-harvesting complexes. *The Plant Journal* 79, 118-126. doi: 10.1111/tpj.12543.
- Serganov, A. (2009). The long and the short of riboswitches. *Current Opinion in Structural Biology* 19, 251-259. doi: 10.1016/j.sbi.2009.02.002.
- Serganov, A., y Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell* 152, 17-24. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.024.
- Sharma, C.M., Papenfort, K., Pernitzsch, S.R., Mollenkopf, H.J., Hinton, J.C., y Vogel, J. (2011). Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Molecular Microbiology* 81, 1144-1165. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07751.x.
- Sharma, C.M., y Vogel, J. (2014). Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Current Opinion in Microbiology* 19, 97-105. doi: 10.1016/j.mib.2014.06.010.
- Shi, T., y Falkowski, P.G. (2008). Genome evolution in cyanobacteria: The stable core and the variable shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2510. doi: 10.1073/pnas.0711165105.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., et al. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1053-1058. doi: 10.1073/pnas.1217107110.

Bibliografía

- Shimoni, Y., Friedlander, G., Hetzroni, G., Niv, G., Altuvia, S., Biham, O., et al. (2007). Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Molecular Systems Biology* 3, 138. doi: 10.1038/msb4100181.
- Singh, A.K., y Sherman, L.A. (2002). Characterization of a stress-responsive operon in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Gene* 297, 11-19.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., y Vogel, J. (2007). The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 63, 193-217. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05489.x.
- Smirnov, A., Förstner, K.U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D., et al. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 11591-11596. doi: 10.1073/pnas.1609981113.
- Sorek, R., y Cossart, P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature Reviews Genetics* 11, 9-16. doi: 10.1038/nrg2695.
- Stanier, R.Y., y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* 31, 225-274. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.001301.
- Stebegg, R., Wurzinger, B., Mikulic, M., y Schmetterer, G. (2012). Chemoheterotrophic growth of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 dependent on a functional cytochrome c oxidase. *Journal of Bacteriology* 194, 4601. doi: 10.1128/JB.00687-12.
- Steglich, C., Futschik, M.E., Lindell, D., Voß, B., Chisholm, S.W., y Hess, W.R. (2008). The challenge of regulation in a minimal photoautotroph: non-coding RNAs in *Prochlorococcus*. *Plos Genetics* 4, e1000173. doi: 10.1371/journal.pgen.1000173.
- Stewart, W.D., Fitzgerald, G.P., y Burris, R.H. (1967). *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58, 2071-2078.
- Stewart, W.D.P., y Codd, G.A. (1975). Polyhedral bodies (carboxysomes) of nitrogen-fixing blue-green algae. *British Phycological Journal* 10, 273-278. doi: 10.1080/00071617500650291.
- Storz, G., Vogel, J., y Wassarman, K.M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular Cell* 43, 880-891. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.022.
- Sun, X., Zhulin, I., y Wartell, R.M. (2002). Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Research* 30, 3662-3671.
- Tandeau de Marsac, N., y Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters* 104, 119-189. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05866.x.
- Thomas, J., Meeks, J.C., Wolk, C.P., Shaffer, P.W., y Austin, S.M. (1977). Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *Journal of Bacteriology* 129, 1545-1555.
- Thomason, M.K., y Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annual Review of Genetics* 44, 167-188. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163523.

- Thompson, A.W., Huang, K., Saito, M.A., y Chisholm, S.W. (2011). Transcriptome response of high- and low-light-adapted *Prochlorococcus* strains to changing iron availability. *The ISME Journal* 5, 1580-1594. doi: 10.1038/ismej.2011.49.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., y Ohno, T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5442-5447. doi: 10.1073/pnas.0600999103.
- Tucker, B.J., y Breaker, R.R. (2005). Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 342-348. doi: 10.1016/j.sbi.2005.05.003.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., y Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 327-338.
- Ungerer, J.L., Pratte, B.S., y Thiel, T. (2008). Regulation of fructose transport and its effect on fructose toxicity in *Anabaena* spp. *Journal of Bacteriology* 190, 8115-8125. doi: 10.1128/JB.00886-08.
- Updegrove, T.B., Zhang, A., y Storz, G. (2016). Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Current Opinion in Microbiology* 30, 133-138. doi: 10.1016/j.mib.2016.02.003.
- Urban, J.H., y Vogel, J. (2007). Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 35, 1018-1037. doi: 10.1093/nar/gkl1040.
- Valladares, A., Maldener, I., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Herrero, A. (2007). Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 189, 4425-4430. doi: 10.1128/jb.00220-07.
- Valladares, A., Rodríguez, V., Camargo, S., Martínez-Noel, G.M., Herrero, A., y Luque, I. (2011). Specific role of the cyanobacterial PipX factor in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 193, 1172-1182. doi: 10.1128/jb.01202-10.
- van den Heuvel, R.H.H., Curti, B., Vanoni, M.A., y Mattevi, A. (2004). Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 669-681. doi: 10.1007/s00018-003-3316-0.
- Vijayan, V., Jain, I.H., y O'Shea, E.K. (2011). A high resolution map of a cyanobacterial transcriptome. *Genome Biology* 12, R47. doi: 10.1186/gb-2011-12-5-r47.
- Vioque, A. (1997). The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Research* 25, 3471-3477.
- Vogel, C., y Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13, 227-232. doi: 10.1038/nrg3185.
- Voigt, K., Sharma, C.M., Mitschke, J., Lambrecht, S.J., Voß, B., Hess, W.R., et al. (2014). Comparative transcriptomics of two environmentally relevant cyanobacteria reveals unexpected transcriptome diversity. *The ISME Journal* 8, 2056-2068. doi: 10.1038/ismej.2014.57.

Bibliografía

- Voß, B., Bolhuis, H., Fewer, D.P., Kopf, M., Möke, F., Haas, F., et al. (2013). Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. *Plos One* 8, e60224. doi: 10.1371/journal.pone.0060224.
- Voß, B., Georg, J., Schon, V., Ude, S., y Hess, W.R. (2009). Biocomputational prediction of non-coding RNAs in model cyanobacteria. *BMC Genomics* 10, 123. doi: 10.1186/1471-2164-10-123.
- Voß, B., Gierga, G., Axmann, I.M., y Hess, W.R. (2007). A motif-based search in bacterial genomes identifies the ortholog of the small RNA Yfr1 in all lineages of cyanobacteria. *BMC Genomics* 8, 375. doi: 10.1186/1471-2164-8-375.
- Wade, J.T., y Grainger, D.C. (2014). Pervasive transcription: illuminating the dark matter of bacterial transcriptomes. *Nature Reviews Microbiology* 12, 647-653. doi: 10.1038/nrmicro3316.
- Wagner, E.G.H., y Romby, P. (2015). Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Advances in Genetics* 90, 133-208. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.05.001.
- Waldbauer, J.R., Rodrigue, S., Coleman, M.L., y Chisholm, S.W. (2012). Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *Plos One* 7, e43432. doi: 10.1371/journal.pone.0043432.
- Wang, H.L., Postier, B.L., y Burnap, R.L. (2004). Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 5739-5751. doi: 10.1074/jbc.M311336200.
- Waters, L.S., y Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615-628. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.043.
- Wenner, N., Maes, A., Cotado-Sampayo, M., y Lapouge, K. (2014). NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environmental Microbiology* 16, 1053-1068. doi: 10.1111/1462-2920.12272.
- Wilde, A., y Hihara, Y. (2016). Transcriptional and postranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857, 296-308. doi: 10.1016/j.bbabo.2015.11.002.
- Wildon, D., y Mercer, F. (1963). The ultrastructure of the heterocyst and akinete of the blue-green algae. *Archives in Microbiology* 47, 19-31. doi: 10.1007/BF00408286.
- Winkenbach, F., y Wolk, C.P. (1973). Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant Physiology* 52, 480-483.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.
- Wolk, C., Thomas, J., W Shaffer, P., Austin, S., y Galonsky, A. (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *The Journal of Biological Chemistry* 251, 5027-5034.

- Wood, N.B., y Haselkorn, R. (1976). Protein degradation during heterocyst development in *Anabaena*. En Codd G. A. y Stewart, W. D. P. (eds), *Proc. 2nd Int. Symp. Photosynth. Prokaryotes*, Dundee, Scotland.
- Wright, P.R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D.A., Richter, A.S., Lott, S., et al. (2014). CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Research* 42, W119-W123. doi: 10.1093/nar/gku359.
- Wright, P.R., Richter, A.S., Papenfort, K., Mann, M., Vogel, J., Hess, W.R., et al. (2013). Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3487-3496. doi: 10.1073/pnas.1303248110.
- Xiong, W., Brune, D., y Vermaas, W.F. (2014). The gamma-aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* 93, 786-796. doi: 10.1111/mmi.12699.
- Yamanaka, G., y Glazer, A. (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Archives in Microbiology* 124, 39-47. doi: 10.1007/BF00407026.
- Yamanaka, G., y Glazer, A.N. (1983). Phycobiliproteins in *Anabaena* 7119. En Papageorgiou G. L. y Packer L. (eds), *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function*. Elsevier Science Publishers B. V., New York. pp 69-94.
- Zhang, C.-C., Zhou, C.-Z., Burnap, R.L., y Peng, L. (2018). Carbon/Nitrogen metabolic balance: Lessons from cyanobacteria. *Trends in Plant Science* 23, 1116-1130. doi: 10.1016/j.tplants.2018.09.008.
- Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.-M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., et al. (2012). Operon *flv4-flv2* provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *The Plant Cell* 24, 1952-1971. doi: 10.1105/tpc.111.094417.
- Zhang, S., y Bryant, D.A. (2011). The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* 334, 1551. doi: 10.1126/science.1210858.
- Zhao, M.-X., Jiang, Y.-L., He, Y.-X., Chen, Y.-F., Teng, Y.-B., Chen, Y., et al. (2010). Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12487. doi: 10.1073/pnas.1001556107.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415. doi: DOI: 10.1093/nar/gkg595.